

Université de Montréal

**Influence de la température sur les mouvements précoces
chez l’opossum *Monodelphis domestica***

Par Edith Corriveau-Parenteau

Département de Sciences biologiques
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté
en vue de l’obtention du grade Maîtrise ès sciences (M. Sc.)
en Sciences biologiques

Mai 2018

©Edith Corriveau-Parenteau

Université de Montréal
Faculté des arts et des sciences

Le mémoire intitulé :

**Influence de la température sur les mouvements précoces
chez l’opossum *Monodelphis domestica***

Présenté par

Edith Corriveau-Parenteau

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Thérèse Cabana (présidente)

Dr Frédéric Bretzner (membre du jury)

Dr Jean-François Pflieger (directeur de recherche)

Résumé

Chez les animaux, les changements de la température externe sont détectés par des fibres nerveuses situées dans la peau et les muqueuses et qui expriment des récepteurs thermosensibles. Chez les mammifères, ce système sensoriel a surtout été étudié chez les animaux matures, et par conséquent, son développement est encore très peu connu. C'est pourquoi nous avons utilisé l'opossum nouveau-né pour évaluer si la thermosensation est fonctionnelle à des stades précoces de développement, et ce, à l'aide des préparations *in vitro* de système nerveux où la peau de la face et des membres antérieurs (MA) a été conservée. L'opossum est un mammifère marsupial qui naît dans un état particulièrement immature, mais qui grimpe sur le ventre de la mère vers une tétine où il s'attache. Des stimulations de la face par éjections de liquide froid, neutre et chaud ont permis d'induire des mouvements des MA et les réponses ont été observées sous un microscope ou enregistrées en électromyographie. Les stimulations froides se sont avérées beaucoup plus efficaces pour induire de l'activité des MA que celles utilisant le chaud ou le neutre. Des sections du nerf trijumeau et de la moelle épinière ont permis de démontrer que les réponses thermiques sont au moins partiellement médiées par le trijumeau. L'ablation de peau entraîne une diminution des réponses aux températures froides, et abolit celles aux stimulations chaudes et neutres. Des résultats en immunohistochimie et en RT-PCR suggèrent que TRPM8, le principal récepteur sensible au froid chez les mammifères adultes, n'est pas exprimé chez l'opossum à la naissance. Globalement, la présente étude démontre que l'opossum nouveau-né est sensible à la température, mais surtout au froid et que cette sensation ne semble pas médiée par le récepteur TRPM8.

Mots-clé: Thermosensation, trijumeau, TRPM8, développement, comportements moteurs.

Abstract

Changes in external temperature are detected by nerve fibres located in the skin and mucosae that express thermosensitive receptors. In mammals, thermosensation is mostly studied in mature animals and little is known about its development. We use the newborn opossum as a model of study to assess if thermosensation is functional at early stages of development, using *in vitro* preparations of brainstem and spinal cord where both facial skin and forelimbs (FL) were kept. Like other marsupials, newborn opossums are very immature at birth, but must climb on the mother's belly to find a teat where they attach. Stimulations consisted of puff ejections of liquids at cold, neutral and hot temperatures directed towards the face, and FL responses were observed visually under a microscope or triceps activity was recorded in electromyography. Cold temperatures always induced FL or muscular responses, but neutral and hot temperatures were less potent to do so. Sections of the trigeminal nerve and spinal cord showed that thermal responses are at least partially mediated through the trigeminal nerve. Facial skin removal abolished FL responses to hot and neutral stimulation, but only decreased those to cold temperature. Immunohistochemistry and RT-PCR suggest that TRPM8, the main receptor involved in cold sensation in adult mammals, is not expressed in opossum at birth. Overall the present study demonstrates that the newborn opossum is sensitive to temperature, but mostly to cold and that this sensation is not mediated by TRPM8.

Keywords: Thermosensation, trigeminal system, TRPM8, development, motor behaviors.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures	iv
Liste des figures de l'article.....	v
Liste des tableaux de l'article	vi
Liste des abréviations.....	vii
Remerciements.....	ix
1. Introduction générale	1
1.1 La thermosensation	2
1.1.1 Les « Transient Receptor Potential » : des thermomètres moléculaires.....	4
1.1.2 Autres récepteurs thermosensibles	11
1.1.3 Intégration neuronale des inputs thermosensibles.....	14
1.1.4 Développement de la thermosensation.....	17
1.2 L'opossum <i>Monodelphis domestica</i>	21
1.2.1 Développement général de l'opossum.....	24
1.2.2 État du système nerveux à la naissance	26
1.2.2.1 Le système nerveux central	26
1.2.2.2 Les sens qui influencent le contrôle moteur à la naissance	28
1.3 Trijumeau chez les mammifères	32
1.3.1 Organisation générale chez l'adulte	32
1.3.2 Développement.....	35
1.4 Problématique	37
2. Article scientifique présenté dans ce travail	39
3. Discussion générale	84
Bibliographie.....	90

Liste des figures

Figure 1. Activité typique des fibres thermosensibles de la peau	3
Figure 2. Récepteurs canaux thermosensibles	9
Figure 3. Modèle de différenciation et de maturation des sous-types de neurones sensoriels dans les ganglions des racines dorsales de la souris, des stades embryonnaires à l'âge adulte	20
Figure 4. L'opossum <i>Monodelphis domestica</i>	23
Figure 5. Comparaison du développement morphologique de la souris et de l'opossum	25
Figure 6. Schéma du tronc cérébral montrant le complexe de noyaux sensoriels du trijumeau...	34
Figure 7. Températures respectivement reconnues par TRPA1, TRPM8 et TRPV1-2-3-4 chez la souris, la grenouille et la drosophile	86
Figure 8. Habitat naturel de <i>Monodelphis domestica</i>	88

Liste des figures de l'article

Figure 1. Observation of FL movements experiments.....	67
Figure 2. EMG experiments.....	68
Figure 3. Percentage of FL responses after cold, neutral or hot stimulations.....	69
Figure 4. Comparison of rhythmic and uncoordinated responses after thermal stimulation in FL observation experiments	70
Figure 5. EMG recordings of the triceps muscles following thermal stimulations	71
Figure 6. Compilation of EMG responses for all specimens	72
Figure 7. TRPM8 immunoreactivity in transverse sections of cephalic tissues of newborn opossums.....	73
Figure 8. RT-PCR gels illustrating the expression of GAPDH and TRPM8 in the head of newborn opossums and in adult testis.....	74

Liste des tableaux de l'article

Table 1. <i>Monodelphis domestica</i> specific primers used in RT-PCR experiments.....	75
Table 2. Percentage of non-locomotor and locomotor-like FL movements in 34 in vitro preparations of newborn opossums.....	76
Table 3. Statistical tests performed for behavioral observations and EMG recording.	77
Supplementary Table 1. Average FL response in behavioral observation experiments.....	80
Supplementary Table 2. Average intensity of EMG responses to different temperatures.....	81
Supplementary Table 3. Latency before the onset of response after temperature stimulation in EMG recordings.....	82
Supplementary Table 4. Ratio of triceps responses / stimulation attempts in EMG experiments.	83

Liste des abréviations

[nom de protéine]- : Expression négative de la protéine

[nom de protéine]+ : Expression positive de la protéine

5G : Ganglion du trijumeau

5N : Nerf trijumeau

ARNm : ARN messenger

cDNA : ADN complémentaire (*complementary DNA*)

CNS: *Central nervous system*

CPG : *Central pattern generator*

DRG : Ganglion des racines dorsales (*dorsal root ganglia*)

DTR : Récepteur de la toxine tétanique (*diphtheria toxin receptor*)

E* : Jour de développement embryonnaire *n*

EMG : Électromyographie

eTRPM8 : *epithelial TRPM8*

FL : *Forelimbs*

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase

IB4 : isolectine B4

KO : *knock-out*

MA : Membres antérieurs

ME : Moelle épinière

Nav : Canaux sodiques voltages dépendants

P* : Jour postnatal n

POA : Aire préoptique de l'hypothalamus

RE : Réticulum endoplasmique

SA1 : *slowly adapting type 1*

SNC : Système nerveux central

STIM1 : *Stromal interacting molecule 1*

TRP : *Transient receptor potential*

Vc : Noyau caudalis

Vi : Noyau interpolaris

Vmes : Noyau mésencéphalique du trijumeau

Vo : Noyau oralis

Vpr : Noyau principal du trijumeau

Vsp : Noyau spinal du trijumeau

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche Jean-François Pflieger, de qui j'ai énormément appris. Merci de m'avoir encouragée et guidée durant mes études, ainsi que pour le partage de réflexions autant humoristiques que philosophiques. Je voudrais également remercier Thérèse Cabana pour ses judicieux conseils, notamment lors des révisions de texte, et de sa bonne humeur et son entrain.

Je remercie Annie Angers pour avoir contribué à mes recherches et pour m'avoir initiée à la technique de RT-PCR. Merci à Frédéric Bretzner pour ses commentaires comme membre du jury du présent mémoire.

Je remercie Louise Pelletier pour son soutien technique au microscope et au cryostat, ainsi que pour sa grande générosité (en temps et en brownies). De plus, je remercie Sophie Breton pour m'avoir permis d'utiliser son laboratoire pour mes expériences, ainsi que ses étudiants, dont Philip, qui m'a souvent prêté main forte.

Aussi, je voudrais remercier mes collègues et amis du laboratoire. D'abord Frédéric, pour son accueil chaleureux et son aide au labo, et pour avoir été un complice scientifique hors du commun. Ensuite, je remercie Ariane qui a non seulement participé à mon projet, mais qui a mis de la vie au laboratoire. Merci également à tous les stagiaires de premier cycle qui ont fait progresser mes expériences.

Finalement, je remercie ceux qui n'ont pas pris part directement à mon projet, mais qui ont joué un rôle important dans ma réussite, soit mes parents, mon parrain et ma marraine, mon amoureux, et mes amis.

1. Introduction générale

Dans le deuxième tome de *De Anima*, Aristote décrit cinq sens que possèdent les animaux et les organes qui y sont associés : la vue avec les yeux, l'ouïe avec les oreilles, l'odorat avec le nez, le goût avec la langue et le toucher avec la peau (la « chair ») (Shields, 2016). On sait aujourd'hui qu'il existe d'autres modalités sensorielles telles que l'équilibre et la proprioception. De plus, ce qu'Aristote décrivait comme *le toucher* désigne toute sensation perçue par la peau, sans distinction entre la perception des textures et pressions ou de la température, qui sont désormais des modalités sensorielles connues et différentes. En fait, si certains systèmes sont très bien définis et possèdent des organes sensoriels spécialisés, tel que le système visuel dont la rétine est constituée de cellules spécifiquement sensibles à la lumière, ce n'est pas toujours le cas. En effet, les sensations extéroceptives (perception par la peau), intéroceptives (viscérales) et proprioceptives (position du soi) forment un système hétérogène complexe, le système somatosensoriel (pour plus de détails voir Kandel et al., 2012, ch. 21-22; Craig, 2003). Les modalités sensorielles qui forment les sensations extéroceptives sont la mécanoréception, soit la perception des pressions et des textures; la nociception qui est la perception de la douleur; et la thermosensation, c'est-à-dire la perception de la température, et c'est cette dernière qui fera l'objet du travail effectué dans le présent mémoire.

Cette étude de la thermosensation s'inscrit dans le cadre général d'un programme de recherche portant sur le développement sensorimoteur chez les mammifères avec, pour modèle expérimental, l'opossum *Monodelphis domestica*. Comme les autres marsupiaux, l'opossum naît dans un état très immature par rapport aux placentaires, et doit grimper sur le ventre de sa mère pour atteindre une mamelle à laquelle il s'accroche pour poursuivre son développement. Les sens céphaliques qui influencent les mouvements du petit vers la mamelle sont encore aujourd'hui

mal compris. Néanmoins, des études récentes effectuées dans notre laboratoire nous permettent de croire que l'opossum nouveau-né pourrait être sensible à la température au niveau de la face et que cela pourrait influencer ses comportements moteurs. Ainsi, la première section de ce mémoire présente une revue des connaissances actuelles sur la sensation de la température externe chez les mammifères et du développement de celle-ci; la deuxième porte sur les caractéristiques de l'opossum comme modèle expérimental du développement sensorimoteur; et finalement la troisième aborde le système du trijumeau, responsable, entre autres, de la somesthésie faciale.

1.1 La thermosensation

La perception des variations extérieures de température permet aux animaux d'adapter leurs comportements afin d'éviter les environnements qui ne leur sont pas favorables, en plus d'influencer le maintien d'un équilibre homéostatique (revues de Patapoutian et al., 2003; Scheppers et Ringkamp, 2008; Vriens et al., 2014). Ces changements sont perçus par des récepteurs dispersés dans la peau ou dans les muqueuses qui activent à leur tour les prolongements périphériques de neurones sensoriels dont les corps cellulaires se trouvent dans des ganglions des racines dorsales (DRG) de la moelle épinière (ME) et des nerfs crâniens. Les fibres qui innervent la peau varient dans leur taille et leur myélinisation. On retrouve les fibres A α et A β qui sont de gros calibre et qui sont fortement myélinisées ainsi que les fibres A δ et C qui sont de petit calibre et dont l'axone est peu ou pas myélinisé, respectivement (Kandel et al., 2012, ch. 22). Les fibres thermosensorielles peuvent percevoir différentes gammes de températures selon les récepteurs qu'elles expriment, soit le froid nocif (<15°C; *noxious cold*), le froid inoffensif (15-33°C;

innocuous cold), la chaleur inoffensive (33-45°C; *innocuous heat*) et la chaleur nocive (>45°C; *noxious heat*) (Vriens et al., 2014). Les températures inoffensives activent typiquement des fibres thermosensorielles A δ et C, et peuvent également activer des fibres mécanosensorielles à bas seuil A β , alors que les températures nocives activent spécifiquement des fibres C polymodales (Filingeri, 2016).

Les fibres sensibles aux températures inoffensives sont constitutivement actives et sont dites à adaptation rapide, car leurs réponses sont rapides et transitoires, et elles s'arrêtent lorsque la température ne varie plus. Celles qui répondent au froid augmentent leur fréquence de décharge lors d'une diminution de température et diminuent leur fréquence de décharge lors d'un réchauffement. Inversement, les fibres qui répondent au chaud augmentent leur fréquence de décharge avec une hausse de température et diminuent leur fréquence de décharge durant un refroidissement (Figure 1; Scheppers & Ringkamp, 2008; Vriens et al., 2014). Les fibres sensibles aux températures nocives montrent très peu d'adaptation. Celles sensibles au froid nocif commencent à s'activer entre 20 et 10°C et celles sensibles à la chaleur nocive montrent de l'activité vers 43°C. (Scheppers & Ringkamp, 2008; Vriens et al., 2014).

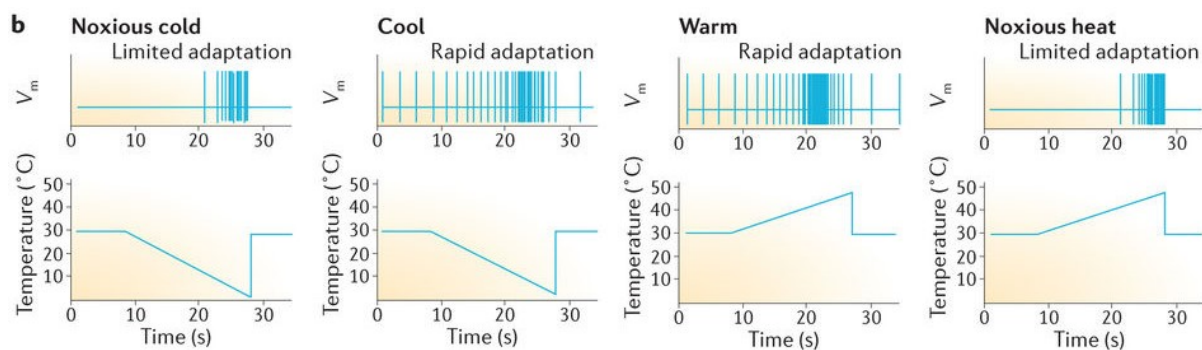


Figure 1. Activité typique des fibres thermosensibles de la peau. Tirée de Vriens et al. (2014).

La perception de la température externe et interne influence la thermorégulation, c'est-à-dire la balance entre la production et la perte de chaleur (Filingeri, 2016). La thermorégulation autonome est contrôlée en grande partie par l'aire préoptique de l'hypothalamus (POA), et dans une moindre mesure par des structures du tronc cérébral et de la ME (Boulant 2000; Almeida et al., 2015; Filingeri, 2016). Par ailleurs, certains neurones de la POA voient leur fréquence de décharge varier en fonction de la température et doivent donc exprimer des récepteurs similaires à ceux retrouvés dans la peau (Boulant, 2000). Lorsqu'une variation de température est détectée, c'est la POA qui commande les tissus jouant un rôle dans la production de chaleur afin de rétablir la température, notamment les muscles responsables du grelottement, les tissus adipeux bruns et la vasomotion (Almeida et al., 2015).

1.1.1 Les « Transient Receptor Potential » : des thermomètres moléculaires

Au cours des deux dernières décennies, de nombreuses études se sont penchées sur l'identification des récepteurs sensibles à la température, et celles-ci ont révélé que les canaux ioniques non-sélectifs de la famille des *transient receptor potential* (TRP) agiraient comme thermomètres moléculaires et seraient les principaux détecteurs de température chez les animaux.

Les TRP ont été d'abord découverts chez le mutant *trp* de la drosophile dont les photorécepteurs présentent une anomalie qui engendre une réponse transitoire – plutôt que soutenue – à la lumière vive (Cosens et Manning 1969; Montell et Rubin, 1989; Hardie et Mink, 1992). Suite à cette découverte chez la drosophile, de nombreux sous-types de TRP ont été identifiés et caractérisés dans une large gamme d'êtres vivants, des levures aux mammifères (Clapham et al., 2005; Bandell et al., 2007; Damann et al., 2008). À ce jour, 28 canaux TRP ont

été identifiés chez les mammifères, qui se divisent en 6 sous-familles : les récepteurs classiques (TRPC), vanilloïdes (TRPV), mélastatine (TRPM), ankyrin (TRPA), polycistine (TRPP) et mucopiline (TRPML) (Clapham et al., 2005). Les formes qui montrent une sensibilité à la température sont souvent appelés thermoTRP dans la littérature. Ceux-ci sont aussi des récepteurs multimodaux car ils sont en plus activés par divers agents chimiques, par les déformations mécaniques ou encore par les changements osmotiques. Les thermoTRP connus pour être exprimés chez les mammifères sont TRPV1-2-3-4, TRPM2-3-4-5-8, TRPC5 et TRPA1. Parmi eux, les plus étudiés ont été TRPV1 et TRPM8. Il est à noter que TRPM4 et TRPM5 ne joueraient aucun rôle dans la thermosensation ou la thermorégulation malgré qu'ils puissent être activés par le chaud et le froid, respectivement (Talavera et al., 2005; Zimmermann et al., 2011). Par conséquent, ils ne seront pas décrits dans la section qui suit.

TRP sensibles au chaud

Le tout premier TRP à avoir été identifié comme thermosensible est TRPV1 (aussi appelé VR1). Chez le rongeur, il est exprimé dans les fibres de petit et moyen calibre (Aδ et C) des DRG, du ganglion du nerf trijumeau (5G) et ceux du nerf vague (Caterina et al., 1997; Helliwell et al., 1998). En expression hétérologue, TRPV1 est activé physiquement par la chaleur nocive avec un seuil d'activation à 43°C, chimiquement par la capsaïcine (molécule irritante retrouvée dans certains aliments, comme les piments forts) ainsi que par les protons (Caterina et al., 1997). Cependant, le rôle de TRPV1 dans la détection de la chaleur nocive *in vivo* est controversé. En culture cellulaire, les neurones ganglionnaires de souris knock-out (KO) pour TRPV1 (TRPV1^{-/-}) sont insensibles au chaud nocif et à la capsaïcine, mais en étude comportementale les souris TRPV1^{-/-} sont insensibles à la capsaïcine sans toutefois présenter une réponse déficitaire évidente au chaud nocif (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000). Des études plus récentes utilisant des techniques

d'ablation génétique suggèrent cependant que TRPV1 joue un rôle important dans la détection du chaud (Figure 2; plus de détails au chapitre 1.1.3; Pogorzala et al., 2013; Yarmolinsky et al., 2016). D'autres études seront nécessaires afin de bien comprendre comment TRPV1 est impliqué dans la thermosensation chez les animaux en condition normale, néanmoins il a un rôle avéré en condition inflammatoire dans les comportements de douleur liés à l'hyperalgésie à la chaleur (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000). TRPV1 est aussi exprimé dans de nombreuses structures cérébrales, dont la POA et le noyau antérieur de l'hypothalamus, où il pourrait participer à la thermorégulation (Caterina 2003, Tominaga et Caterina 2004).

TRPV2 (ou VR1-L) est un autre récepteur sensible à la température nocive et qui est abondamment exprimé dans de nombreux tissus, dont non-neuronaux. En plus d'avoir un seuil d'activation plus élevé ($>52^{\circ}\text{C}$), il se distingue de TRPV1 par son insensibilité à la capsaïcine, aux protons, et par son expression dans les fibres sensorielles de calibre moyen à large (Caterina et al., 1999). Cependant, TRPV2 ne semble pas jouer de rôle dans la détection du chaud *in vivo* puisque chez des souris TRPV1^{-/-}, les fibres C sensibles au chaud nocif n'expriment que très peu TRPV2 (Woodbury et al., 2004). De plus, le comportement des souris TRPV2^{-/-} vis-à-vis du chaud nocif n'est pas altéré par la délétion de ce gène, et les doubles mutants pour TRPV1 et TRPV2 ont des comportements semblables à ceux des simples mutants TRPV1^{-/-} (Park et al., 2011).

TRPV3 est un détecteur du chaud inoffensif sensible au camphre et au 2-APB (Chung et al., 2004; Moqrich et al., 2005). Son seuil d'activation et son expression dans les tissus varient entre les espèces. Par exemple, chez la souris, TRPV3 a un seuil d'activation à $33\text{-}35^{\circ}\text{C}$ et est exprimé dans les kératinocytes mais pas dans les neurones ganglionnaires, alors que chez l'humain, il a un seuil d'activation d'environ 39°C et est exprimé abondamment dans les neurones, dont une forte proportion de ceux des ganglions (Peier et al., 2002a, Smith et al., 2002, Xu et al., 2002).

Chez la souris, il semble jouer un rôle dans la détection du chaud inoffensif puisque des souris TRPV3-/- perdent leur sensibilité pour cette gamme de température (Figure 2; Moqrich et al., 2005). Néanmoins, TRPV3 ne parvient pas à expliquer les réponses résiduelles à la chaleur chez les souris TRPV1-/- (Zimmermann et al., 2005). Les souris doubles mutantes pour TRPV1 et TRPV3 peuvent montrer une diminution de la reconnaissance du chaud nocif, sans toutefois l'abolir complètement, suggérant un rôle partiel pour ces deux récepteurs *in vivo* en plus de mécanismes supplémentaires (Marics et al., 2014).

TRPV4 est également activé par le chaud inoffensif, entre 25 et 42°C, avec des seuils variables selon les espèces, et son activation par la chaleur est directement modulée par l'osmolarité (Güler et al., 2002; Watanabe et al., 2002). TRPV4 est exprimé dans l'hypothalamus, où il semble contribuer aux mécanismes thermorégulateurs (Güler et al., 2002; Yadav et al., 2017). Aussi exprimé dans les kératinocytes plantaires chez la souris, il ne serait que faiblement retrouvé dans les neurones ganglionnaires spinaux et du trijumeau (Figure 2; Güler et al., 2002). Les kératinocytes de souris en culture montrent une activité en réponse à la chaleur inoffensive (>33°C) dépendante de TRPV4, ce qui suggère que TRPV4 est impliqué dans la détection de la chaleur *in vivo*, et ce, possiblement en collaboration avec TRPV3 qui est aussi exprimé dans ces cellules (Figure 2; Chung et al., 2003). Néanmoins, les souris double mutantes pour TRPV3 et TRPV4 ne présentent aucune différence comportementale significative par rapport aux températures chaudes (Huang et al., 2011).

D'autres thermoTRP ont été mis en évidence plus récemment, et par conséquent la littérature à leur sujet est encore lacunaire. Parmi eux, TRPM3 est largement exprimé dans les neurones des DRG et du 5G, tout particulièrement dans les neurones de petit calibre, et est activé par le chaud nocif et par le sulfate de prégnénolone (Vriens et al., 2011). Les souris TRPM3-/-

montrent un déficit dans les comportements d'hyperalgésie au chaud, ce qui suggère un rôle lié à celui de TRPV1 (Figure 2; Vriens et al., 2011). Le thermoTRP qui a été caractérisé le plus récemment est TRPM2 : il est sensible au chaud et est activé par des ligands endogènes intracellulaires, et des dérivés réactifs de l'oxygène comme le H₂O₂ (Song et al., 2016; Tan et McNaughton, 2016; Kashio et Tominaga, 2017). Il s'agirait d'un bon candidat pour travailler en synergie avec d'autres thermoTRP dans la thermosensation (figure 2). Son seuil d'activation est variable, allant du chaud inoffensif au chaud nocif et serait grandement influencé par le H₂O₂ (Kashio et Tominaga, 2012; Song et al., 2016; Tan et McNaughton, 2016). Dans le système nerveux périphérique, TRPM2 est exprimé dans les neurones des ganglions sympathiques cervicaux et ptérygo-palatin, et dans ceux des ganglions spinaux, où il peut être en partie coexprimé avec TRPV1 et TRPM3 (Tan et McNaughton, 2016). La délétion de TRPM2 affecte substantiellement les réponses des neurones en imagerie calcique entre 34 et 42°C, et altère la réponse au chaud chez les souris TRPM2^{-/-} (Tan et McNaughton, 2016). Dans le cerveau, TRPM2 est exprimé dans des neurones de la POA de l'hypothalamus et semble participer à la thermorégulation et au contrôle de la fièvre (Song et al., 2016).

TRP sensibles au froid

Depuis longtemps le menthol est utilisé comme traitement thérapeutique pour ses effets rafraichissants et analgésiants. En se basant sur le patron de décharge de certaines fibres nerveuses de la langue chez le chat, Hensel et Zotterman (1951) proposent l'existence de thermorécepteurs sensibles au froid qui seraient activés par le menthol, mais cette hypothèse demeure spéculative. Ce n'est qu'une cinquantaine d'années plus tard qu'un récepteur au froid sera identifié, et il est aujourd'hui connu sous le nom de TRPM8 (ou CMR1, « *cold and menthol receptor 1* »). Exprimé dans les neurones constituant les fibres de petit calibre (C et Aδ) des neurones des DRG et du 5G,

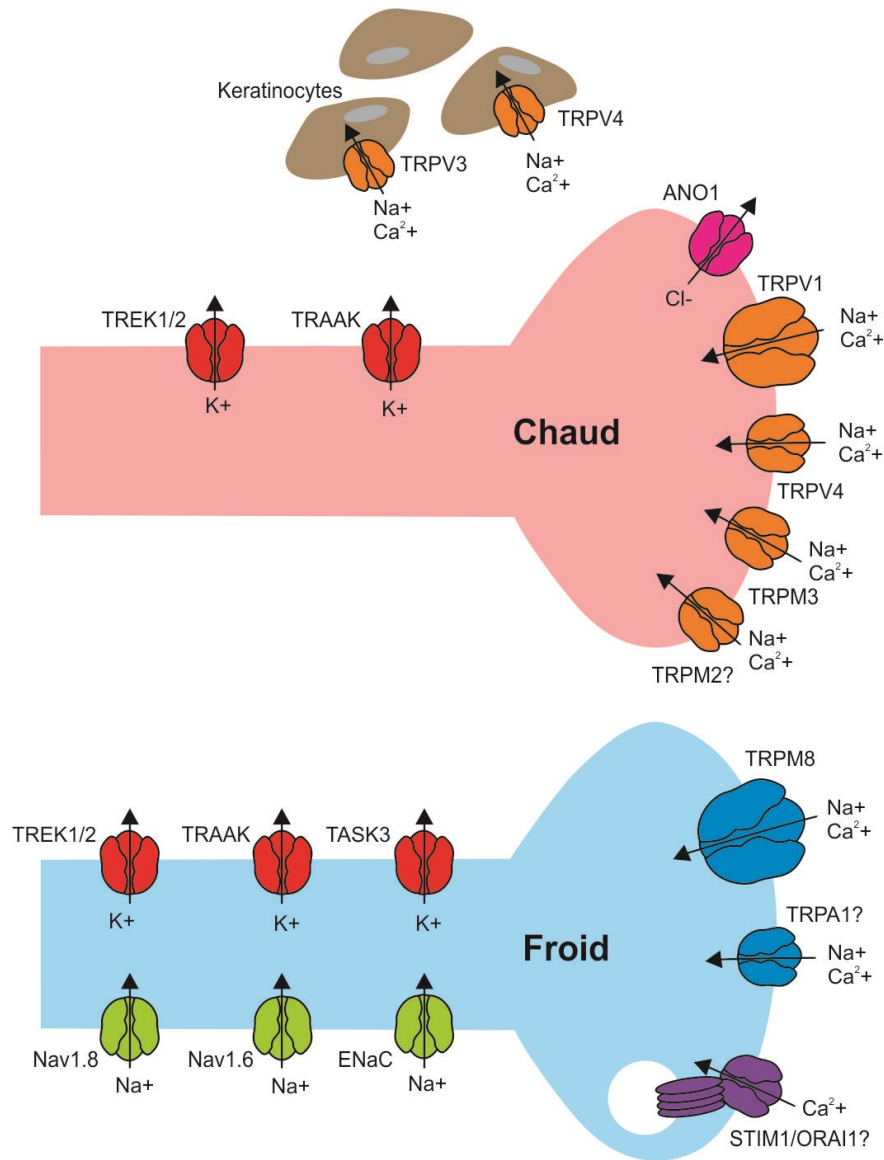


Figure 2. Récepteurs canaux thermosensibles. TRPV1, TRPM2-3 et TRPV4 pourraient être impliqués dans la détection du chaud par les terminaisons nues de la peau et leur sensibilité pourrait être modulée par les canaux de fuite potassique et ANO1. Dans la peau, les kératinocytes exprimant TRPV3 et TRPV4 pourraient envoyer un signal chimique aux afférences primaires pour déclencher les réponses nerveuses en réponse à un stimulus chaud. Dans les terminaisons nerveuses, TRPM8 est le principal acteur dans la détection du froid, possiblement avec TRPA1. Leur activité pourrait être modulée par les canaux de fuite potassiques et les canaux sodiques voltage dépendants. Le rôle potentiel de STIM1 et ORAI1 dans la perception du froid est encore mal compris. Adaptée de Palkar et al., 2015.

TRPM8 est activé par les températures sous les 23-27°C et ce jusqu'à 8-15°C en culture cellulaire, en plus d'être sensible au menthol, à l'eucalyptol et à l'icilin (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002b). Chez les animaux intacts, TRPM8 semble directement impliqué dans la détection du froid inoffensif et nocif puisque les souris TRPM8^{-/-} montrent des déficits importants dans la reconnaissance du froid, et ce même à de basses températures (Figure 2; Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007; Dhaka et al., 2007). Cependant, d'autres récepteurs doivent être impliqués dans la reconnaissance du froid, car une proportion minoritaire de neurones répondant au froid en culture de cellules du 5G est insensible au menthol, et cette même population persiste chez les rongeurs TRPM8^{-/-} (Thut et al., 2003; Babes et al., 2004; 2006; Bautista et al., 2006; 2007).

TRPA1 (ou ANKTM1) est sensible au froid nocif (>17°C) et à l'icilin et est exprimé dans une faible proportion de neurones de petit calibre des DRG et du 5G (Figure 2; Story et al., 2003). Dans ces tissus, il peut être coexprimé avec TRPV1 mais pas avec TRPM8. TRPA1 est spécifiquement activé par le cinnamaldéhyde, composante de la cannelle, et par l'allyl isothiocyanate, retrouvé dans l'huile de moutarde, en plus d'être activé par la bradykinine et l'acide arachidonique (Bandell et al., 2004; Jordt et al., 2004). Bien qu'il ait été d'abord considéré comme étant un bon candidat pour la détection du froid nocif chez les animaux, d'autres études suggèrent qu'il jouerait plutôt un rôle de nocicepteur sensible aux composés chimiques irritants (Bautista et al., 2006; Bandell et al., 2004; Pogorzala et al., 2013).

Encore peu étudié, TRPC5 est insensible au menthol et est activé par une diminution de la température entre 37°C et 25°C en culture cellulaire. Exprimé par une population de neurones distincts de TRPM8 dans les DRG et dans la corne dorsale de la ME chez la souris et l'humain, TRPC5 pourrait à priori jouer un rôle dans la sensation du froid, cependant les souris TRPC5^{-/-} ne présentent aucun déficit comportemental au froid nocif et inoffensif (Zimmermann et al., 2011).

1.1.2 Autres récepteurs thermosensibles

Canaux potassiques

On désigne par groupe TREK/TRAAK les canaux TREK-1 (KCNK2 ou K2P 2.1), TREK-2 (KCNK10 ou K2P 10.1) et TRAAK (KCNK2 ou K2P 4.1), qui font partie de la famille des canaux de fuite potassiques à 2 domaines en pores (K2P) qui contribuent notamment à maintenir le potentiel membranaire. Exprimés dans de nombreux types de cellules, dont les neurones, ils sont sensibles aux stimuli mécaniques, à divers composés chimiques, et à l'élévation de la température, qui provoque une ouverture graduelle des canaux (Figure 2; Schneider et al., 2014). De manière inverse, la baisse de température engendre une dépolarisation des neurones en empêchant la fuite cationique.

TREK-1, le plus étudié de ce groupe, a une sensibilité maximale à la température entre 32 et 37°C, et est abondamment exprimé dans le système nerveux central (SNC), notamment dans l'hypothalamus, et dans les neurones sensoriels périphériques (Maingret et al., 2000; Honoré, 2007). TREK-2 et TRAAK sont également actifs à des températures physiologiques (~37°C) et sont aussi présents dans les neurones ganglionnaires spinaux (Kang et al., 2005). Les souris knock-out (KO) pour TREK-1, TREK-2, TRAAK, et TREK-1/TRAAK montrent toutes une augmentation de la sensibilité à la température à différents niveaux lors de tests comportementaux; le triple KO TREK-1/TREK-2/TRAAK présente une hypersensibilité thermique pour toutes les gammes de températures (Alloui et al., 2006; Noël et al., 2009; Pereira et al., 2014). Les résultats de ces études suggèrent que les TREK et TRAAK joueraient plutôt un rôle modulateur de l'activité des neurones thermosensoriels plutôt que de véritable détecteurs de température (Figure 2). D'ailleurs, TREK-1 est souvent coexprimé avec TRPV1 et TRPM8 dans les neurones sensoriels

de rongeurs (Alloui et al., 2006; Yamamoto et al., 2009). Par ailleurs, pour que les TREK/TRAAK puissent effectivement moduler l'activité des neurones somatosensoriels, ils devraient être exprimés au niveau des terminaisons sensorielles, ce qui n'a toujours pas été démontré à ce jour (Schneider et al., 2014).

Même s'il n'est pas aussi sensible à la température que les membres du groupe TREEK/TRAAK, TASK-3 (KCNK9 ou K2P9.1) est un autre canal potassique de fuite qui pourrait avoir une influence sur la perception de la température (Figure 2; Kang et al., 2005; Morenilla-Palao et al., 2014). Ce dernier est fortement coexprimé avec TRPM8 dans les neurones des ganglions spinaux chez la souris (Morenilla-Palao et al., 2014). Les souris mutantes pour TASK-3 sont plus sensibles au froid. De plus, en culture cellulaire, leurs neurones ganglionnaires exprimant TRPM8 montrent une élévation de leur température d'activation (~28 à 30°C) en raison d'une diminution des neurones sensibles au froid à haut seuil (Morenilla-Palao et al., 2014).

Canaux sodiques

Lors d'un abaissement de la température sous 37°C, les courants sodiques induits par l'*epithelial sodium channel* (ENaC) augmentent, ce qui en fait à priori un bon candidat dans la détection du froid (Figure 2; Askwith et al., 2001). Chez le rat, on retrouve les sous unités β et γ d'ENaC dans les neurones des ganglions sensoriels, dans les afférences primaires de la peau, et dans les mécanorécepteurs tels que cellules de Merkel, les corpuscules de Meissner et de Pacini (Drummond et al., 2000). Toutefois, ENaC a besoin de sa sous-unité α pour être thermosensible et celle-ci n'est pas présente dans ces tissus, sauf dans le 5G (Drummond et al., 2000; Fricke et al., 2000). Par ailleurs, un inhibiteur d'ENaC, l'amiloride, diminue la réponse au froid chez les neurones du 5G de rat en culture cellulaire, ce qui suggère qu'ENaC pourrait participer à la perception du froid au moins dans les neurones de ce ganglion (Thut et al., 2003).

Très exprimés dans les neurones, les canaux sodiques voltage-dépendants (Nav) peuvent aussi être modulés par la température (Figure 2). Normalement, le froid diminue l'activité neuronale en exerçant une influence sur ces canaux, mais Nav1.8 se montre résistant à cette inactivation et serait impliqué plus particulièrement dans les mécanismes de douleur reliée au froid (Zimmermann et al., 2007). Nav1.6 jouerait un rôle dans la douleur en cas pathologique en lien avec l'allodynie au froid (Deuis et al., 2013). Dans l'ensemble, l'implication des Nav dans la thermoception a été peu étudiée.

Autres canaux

Le canal Anoctamine 1 (ANO1, ou TMEM16A) est un canal chlorure activé par les ions calciques qui pourrait participer à la détection du chaud nocif (Figure 2; Cho et al., 2012). Fortement coexprimé avec des marqueurs nociceptifs – dont TRPV1 – dans les neurones ganglionnaires de petit calibre, ANO1 est activé par des températures supérieures à 44°C. Lors d'ablation génétique, les souris qui n'expriment pas ANO1 montrent un comportement déficient face au chaud nocif, et, lorsque mesuré dans des neurones sensoriels en culture cellulaire, les courants en réponse à ces températures sont largement diminués (Cho et al., 2012).

Stromal interacting molecule 1 (STIM1) est une molécule de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) qui joue un rôle régulateur des stocks de calcium : quand ceux-ci sont bas, elle s'oligomérisse et est transloquée vers la jonction RE-membrane plasmique. À ce niveau, elle peut se lier à une protéine de la membrane plasmique, ORAI1, qui s'ouvre et fait entrer du calcium dans la cellule (Cahalan, 2009). Néanmoins, une élévation de température au-dessus de 35°C induit l'oligomérisation de STIM1, indépendamment des niveaux de calcium, mais sans induire la translocation et par conséquent l'activation d'ORAI1. Ce n'est que lorsque la température redescend que les deux molécules peuvent se lier et ainsi induire une réponse calcique au froid

(Xiao et al., 2011). Il reste cependant à déterminer si ce mécanisme est susceptible d'influencer la détection de la température chez les animaux.

1.1.3 Intégration neuronale des inputs thermosensibles

Les TRP et les autres récepteurs thermosensibles sont bien caractérisés au niveau cellulaire, mais il reste beaucoup à apprendre sur leur rôle *in vivo* et sur les mécanismes qui permettent l'intégration des signaux thermiques par le SNC. Néanmoins, avec le développement de nouvelles techniques génétiques, les études les plus récentes tendent à montrer que la température serait globalement perçue par des neurones exprimant soit TRPV1, soit TRPM8.

Puisque les souris KO peuvent développer des mécanismes compensatoires au cours du développement en réponse à la délétion d'un gène, une approche alternative est d'induire la mort des neurones qui expriment un gène d'intérêt chez l'animal adulte. Couramment utilisé, l'expression chez la souris du récepteur humain de la toxine diphtérique (*diphtheria toxin receptor*; DTR) est sous le contrôle du promoteur du gène d'intérêt, et l'injection de la toxine diphtérique chez l'animal entraîne la mort des cellules qui fabriquent la protéine (Saito et al., 2001). Les souris TRPM8-DTR présentent un comportement de déficience au froid plus sévère que les souris KO pour TRPM8, auquel s'ajoutent une insensibilité marquée au froid nocif et une aversion pour les températures supérieures à 35°C (Knowlton et al., 2013; Pogorzala et al., 2013). Les souris TRPV1-DTR, elles, se comportent normalement à 30-40°C, mais ne montrent pas de comportement d'aversion à des températures nocives, jusqu'à 50°C (Pogorzala et al., 2013). Ceci suggère que la perception du chaud inoffensif serait en fait le résultat d'une absence de signal aversif en provenance des afférences TRPM8+ et TRPV1+. Par ailleurs, l'ensemble du spectre

thermique serait perçu par TRPV1 et TRPM8 puisque des souris doubles mutantes TRPV1-DTR/TRPM8-DTR n'ont aucune préférence thermique entre 0 et 50°C (Pogorzala et al., 2013).

Ces conclusions sont appuyées par une étude portant sur les patrons d'activation des neurones du 5G de souris en imagerie calcique *in vivo* suite à des stimulations thermiques de la cavité orale allant de 5 à 50°C (Yarmolinsky et al., 2016). Ces auteurs ont remarqué en premier lieu que les neurones activés par les stimuli thermiques sont dispersés au sein du ganglion sans suivre une organisation somatotopique notable. Les neurones sensibles au chaud inoffensif montrent une activation graduelle avec l'élévation de la température, alors que ceux qui répondent au chaud nocif, beaucoup plus nombreux, ont une amplitude de réponse plus forte et sont recrutés au fur et à mesure que la température augmente. Par ailleurs, la majorité des neurones qui répondent au chaud expriment TRPV1. Ceux qui répondent au froid expriment tous TRPM8 mais présentent trois types d'activation : 1) activité soutenue durant le refroidissement jusqu'au froid nocif où ils deviennent silencieux, 2) activité soutenue en réponse au froid nocif, 3) mode intermédiaire entre le type 1 et 2. La perception des températures inoffensives et nocives serait donc encodée par une activation différentielle des fibres exprimant TRPM8 et TRPV1.

Récemment, une étude s'est penchée sur le décodage de la température dans la ME *in situ* utilisant l'imagerie à deux photons (Ran et al., 2016). Les stimulations thermiques ont été faites sur les pattes arrière et l'activité induite au niveau des neurones de la corne dorsale a été enregistrée. Les résultats montrent que les neurones spinaux qui répondent au froid sont activés par les afférences primaires TRPM8+ tandis que ceux qui répondent au chaud nocif et au chaud sont activés par des afférences primaires TRPV1+. Des souris transgéniques dont les neurones expriment TRPV1 ou exprimant TRPM8 sont sensibles à la DTR ont été utilisées pour étudier l'effet de l'élimination de ces récepteurs sur les réponses. L'ablation de TRPV1 à l'aide de DTR

diminue grandement les réponses au chaud inoffensif et nocif, et l'ablation de TRPM8 provoque une baisse des réponses au froid et une augmentation des réponses au chaud, en accord avec des observations comportementales antérieures chez les souris TRPM8-DTR (Mishra et al., 2011; Pogorzala et al., 2013). De plus, Ran et al. (2016) concluent que la perception du froid serait relative alors que la perception du chaud serait absolue. Ce qu'ils veulent dire par cette formule est que les neurones de la corne dorsale sensibles au froid sont actifs durant la phase de changement de température et s'adaptent rapidement lorsque celle-ci devient stable. Ainsi, un abaissement de température de 8°C serait perçu de la même façon que la température initiale soit de 32 ou de 25°C, par exemple. Au contraire, les neurones qui répondent au chaud ne s'adaptent pas durant les phases stables et l'intensité de leur réponse est donc fonction de la température finale. Par exemple, l'intensité de la réponse neuronale sera la même pour un réchauffement de 35 à 43°C que de 27 à 43°C.

Les signaux thermiques périphériques sont principalement transmis aux neurones de la lamina I de la corne dorsale spinale (Almeida, 2015; Filingeri, 2016). Ces neurones projettent au travers de la voie spinothalamique contralatérale vers le POA de l'hypothalamus et vers la partie arrière du noyau ventral médial du thalamus. À partir des noyaux thalamiques, les inputs thermiques peuvent être transmis au cortex somatosensoriel (S1), région essentielle pour la genèse d'une sensation de la température cutanée (Almeida et al., 2015; Filingeri, 2016). En utilisant des souris TRPM8^{-/-}, il a été montré que les neurones corticaux au niveau de S1 ne réagissaient plus aux stimulations froides (Milenkovic et al., 2014).

1.1.4 Développement de la thermosensation

Pour que des organes sensoriels périphériques soient fonctionnels, ils doivent être suffisamment matures en plus d'être connectés adéquatement au SNC. Ceci signifie, dans le cas de la thermosensation, que les récepteurs thermosensibles doivent être exprimés en périphérie et que les neurones ganglionnaires doivent faire synapse avec les neurones centraux, au niveau de la ME ou du tronc cérébral.

Chez la souris, on peut enregistrer des réponses à la capsaïcine dans les neurones des DRG en culture à partir du jour de développement embryonnaire 12.5 (E12.5), ce qui concorde avec le début de l'expression de l'ARN messager (ARNm) de TRPV1 dans ces neurones (Hjerling-Leffler et al., 2007). En immunohistochimie, TRPV1 n'est pas détecté dans les DRG avant E13 chez la souris (Tamura et al., 2005; Funakoshi et al., 2006). Chez le rat, les prolongements centraux des neurones exprimant TRPV1 atteignent la corne dorsale à E16, et au jour de développement postnatal 10 (P10) la topographie des fibres est comparable à celle de l'adulte (Guo et al., 2001). Cependant, même si elles sont immatures, les afférences primaires exprimant TRPV1 établissent des contacts au moins partiellement fonctionnels avec les neurones spinaux dès la naissance chez le rat. En effet, l'application en périphérie de capsaïcine induit l'expression du facteur de transcription précoce et marqueur d'activité des cellules c-Fos dans la corne dorsale chez les animaux intacts (Williams et al., 1990) et des courants post-synaptiques excitateurs dans des préparations *in vitro* (Baccei et al., 2003). À noter qu'un réchauffement de la peau de la patte à 60°C peut provoquer un réflexe du retrait de la patte à P1 chez le rat, mais on ignore si le signal provient bien de la stimulation de TRPV1 puisque des résultats semblables sont obtenus par stimulation électrique et par pincement (Fitzgerald et Gibson, 1984).

Dans les DRG d'embryons de souris en culture, des réponses au menthol peuvent être obtenues à partir de E16.5, donc un peu avant la naissance (qui a lieu vers E21.5), ce qui correspond également au moment où débute l'expression de l'ARNm de TRPM8 (Hjerling-Leffler et al., 2007). En immunohistochimie, on peut détecter de rares cellules exprimant TRPM8 à E17.5 et encore très peu à P0. Les deux premières semaines postnatales montrent une augmentation considérable de l'expression de TRPM8 dans les cellules ganglionnaires : d'environ 3.5% de cellules marquées par ganglion à P0 jusqu'à 16% à P14, où les niveaux sont alors comparables à chez l'adulte (Tamura et al., 2005). Les prolongements centraux des afférences primaires TRPM8+ n'atteignent la corne dorsale qu'à E18.5, mais la topographie des fibres n'est semblable à celle de l'adulte que vers la fin de la deuxième semaine postnatale (P14) (Takashima et al., 2010). Au niveau fonctionnel, la stimulation des afférences primaires par le menthol n'induit pas de courant post-synaptique excitateur dans les neurones de la corne dorsale chez le rat avant environ P10 (Baccei et al., 2003). De manière comparable, chez la souris, la stimulation au menthol sur la patte arrière induit de manière significative du marquage de c-Fos dans les DRG à partir P10 seulement (Takashima et al., 2010). Ces résultats suggèrent donc que la sensation de la réponse au menthol ne devient fonctionnelle que vers cet âge. Toutefois, le menthol agit peut-être en facilitant la réponse des TRPM8 plutôt qu'en la provoquant (Hensel & Zotterman, 1951; McKemy et al., 2002).

On observe donc une maturation relativement tardive des réseaux responsables de la sensation du froid (TRPM8) par rapport à ceux responsables de la sensation du chaud (TRPV1). Néanmoins, chez les rongeurs nouveau-nés, des stimulations de la peau par le chaud nocif et la capsaïcine de même que par le froid et le menthol peuvent moduler l'activité des réseaux locomoteurs spinaux (*central pattern generators* ou CPG) de préparations *in vitro* de système

nerveux avec membre attaché (Blivis et al., 2007; Mandadi et al., 2009). Ces observations suggèrent que les réseaux impliquant TRPM8 doivent aussi être en partie fonctionnels à la naissance, contrairement à ce qu'ont montré les études de Baccei et al. (2003) et Takashima et al. (2010) basées sur, respectivement, des enregistrements cellulaires et de l'immunohistochimie pour c-Fos. Par contre, cette différence pourrait s'expliquer par le fait que ces auteurs se sont concentrés uniquement sur la corne dorsale pour évaluer la maturité de ces réseaux, alors que des contacts fonctionnels peuvent très bien être présents ailleurs dans la ME, notamment dans la corne ventrale.

Concernant ce dernier point, des réponses au froid peuvent être enregistrées dès E12.5 dans les DRG de souris en culture, c'est-à-dire avant l'expression de l'ARNm de TRPM8 (Hjerling-Leffler et al., 2007). Il semble donc que, à l'instar du rongeur adulte (Thut et al., 2003; Babes 2004; 2006; Bautista et al., 2006; 2007), l'embryon possède des mécanismes de reconnaissance du froid indépendants de TRPM8 et que ces mécanismes se mettent en place en premier au cours du développement. Cependant, on ignore si les populations de neurones chez l'adulte expriment leur sensibilité au froid par les mêmes mécanismes que chez l'embryon.

Quant à TRPA1, les réponses à la cinnamaldéhyde débutent dans les cultures de DRG de souris après la naissance (P0), un âge où l'ARNm commence également à être exprimé dans ces neurones (Hjerling-Leffler et al., 2007). À P2-3 chez le rat, des stimulations périphériques à l'huile de moutarde n'induisent pas l'expression de c-Fos dans la ME et les DRG (Williams et al. 1990; Soyguder et al., 1994). L'induction de marquage c-Fos débute à P7 et augmente en intensité jusqu'à P20, alors le marquage atteint une intensité semblable à celle obtenue chez l'adulte (Soyguder et al., 1994). Par ailleurs, l'application d'huile de moutarde sur la patte des ratons ne produit aucun réflexe de retrait à P7 alors qu'il le fait à P11 et que ce réflexe atteint des niveaux

similaires à ceux de l'adulte seulement au cours de la troisième semaine post-natale (Fitzgerald et Gibson, 1984).

Ainsi, ces données supportent une maturation séquentielle des réseaux sensoriels exprimant TRPV1, TRPM8, puis TRPA1. Cette observation a mené Hjerling-Leffler et al. (2007) à proposer un modèle expliquant le développement de l'expression différentielle de ces trois récepteurs. Ils ont montré qu'au cours du développement de la souris, les neurones des DRG peuvent répondre au froid, ou à la capsaïcine, ou au menthol, ou à la cinnamaldéhyde ou à une combinaison de ces quatre stimuli, et que ce patron de sensibilité variait en fonction de l'âge (de E11.5 à adulte) et de l'expression de la protéine isolectine B4 (IB4) par les cellules concernées. Schématiquement, leur modèle (Figure 3) propose qu'une première population de neurones exprime TRPV1 jusqu'à E14.5, et celle-ci se subdivise en deux sous-populations de neurones IB4+

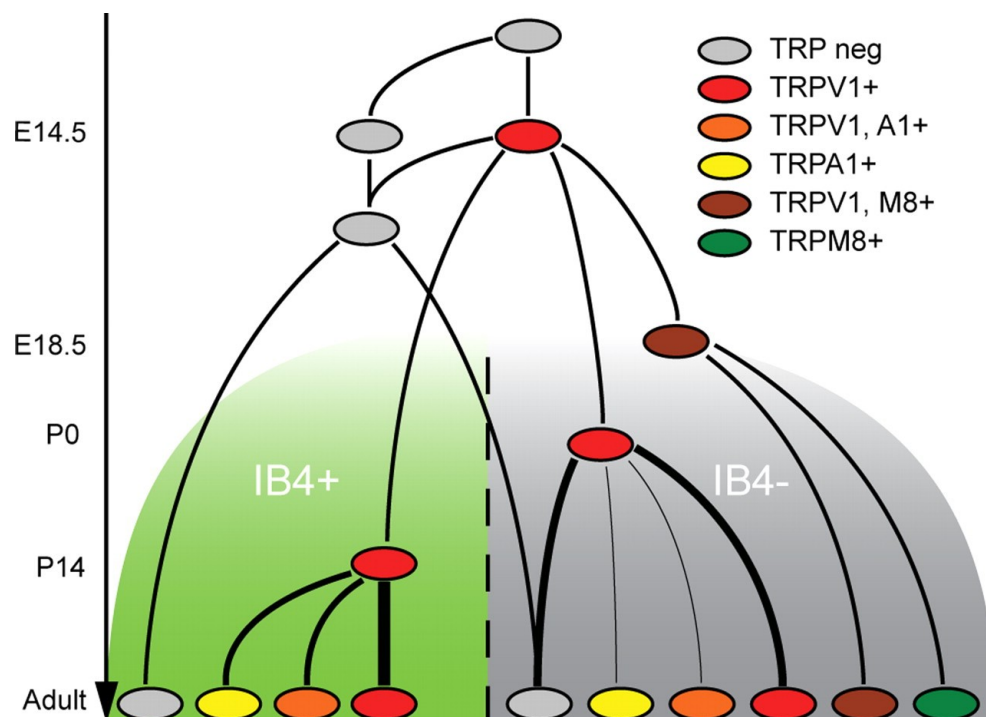


Figure 3. Modèle de différenciation et de maturation des sous-types de neurones sensoriels dans les ganglions des racines dorsales de la souris, des stades embryonnaires à l'âge adulte. Tirée de Hjerling-Leffler et al. (2007).

ou IB4-. En parallèle, chez les IB4+ et IB4-, une population de neurones continue d'exprimer TRPV1 et se différencie de façon à exprimer les trois sous-populations retrouvées chez l'adulte, soit TRPV1+, TRPA1+ ou TRPV1+/TRPA1+. Dans la lignée des IB4- cependant certains neurones exprimant TRPV1 divergent pour exprimer conjointement TRPV1 et TRPM8. Cette dernière lignée se subdivise progressivement jusqu'à l'âge adulte en deux populations distinctes, dont l'une demeure TRPV1+ et TRPM8+ alors que la seconde n'exprime plus TRPV1 (elle devient TRPM8+ / IB4-).

Une forme de support pour ce modèle a été apporté par des souris dont la lignée de neurones TRPV1+ a été éliminée par ablation génétique (Mishra et al., 2011). En effet, tel que prédit par le modèle de Hjerling-Leffler et al. (2007), ces souris n'expriment ni TRPM8 ni TRPA1, en plus de montrer une diminution de l'expression de TRPV2. L'expression de TRPV2 serait plus précoce dans les DRG lombaires et la ME murins que celle de TRPV1 puisqu'il peut être détecté en immunohistochimie 2 jours avant TRPV1, soit à E11.5 (Tamura et al., 2005; Funakoshi et al., 2006), ce qui suggère que la maturation de TRPV2 ne dépend pas entièrement d'une expression préalable de TRPV1.

1.2 L'opossum *Monodelphis domestica* comme modèle expérimental

La classe des mammifères modernes se divise en trois sous-classes, les monotrèmes (protothériens), les marsupiaux (métathériens) et les placentaires (euthériens). On peut les distinguer par des critères morphologiques et anatomiques, mais également physiologiques comme la stratégie de reproduction. Contrairement aux monotrèmes qui sont ovipares, les marsupiaux et les placentaires sont vivipares, et ces derniers diffèrent dans le temps alloué à la période de

gestation relativement à la période de lactation (Kemp, 2005). Par rapport aux placentaires, les marsupiaux ont proportionnellement une courte période de gestation et une longue période de lactation au cours de laquelle les petits poursuivent leur développement en étant accrochés aux tétines de la mère, le plus souvent dans une poche ventrale nommée « marsupium ». Cette courte gestation fait en sorte que les nouveau-nés marsupiaux sont beaucoup plus immatures que les placentaires (Russell, 1982). Néanmoins, le nouveau-né marsupial possède un système sensorimoteur et des membres antérieurs (MA) dont la musculature et le squelette sont suffisamment développés pour parvenir à grimper sur le ventre de la mère à partir du conduit urogénital jusqu'à une mamelle, et ce, sans l'aide de la mère. Lorsqu'il atteint une mamelle, il avale l'extrémité du mamelon et ses lèvres fusionnent plus ou moins complètement avec celle-ci, ce qui lui permet de rester en place jusqu'à plusieurs semaines pour poursuivre son développement (Russell, 1982; Cabana, 2000). Le nombre de petits d'une même portée est limité par le nombre de mamelles sur le ventre de la mère. Il n'est pas rare qu'un nombre supérieur naissent, mais ceux qui ne parviendront pas à s'accrocher à une tétine mourront (Russell, 1982; VandeBerg et William-Blangero, 2010). Comme une partie du développement des voies sensorielles et motrices qui se produit dans l'utérus chez les mammifères placentaires a lieu post-natalement chez les marsupiaux, ces derniers permettent l'accès à des stades précoces pour l'étude développementale du système nerveux sans avoir recours à des prélèvements *in utero*.

Afin d'étudier le développement sensorimoteur chez les mammifères, notre laboratoire utilise l'opossum *Monodelphis domestica*, un petit marsupial au pelage vert-gris (Fig.4A) de la famille des Didelphidés. Cette espèce native d'Amérique du Sud est maintenue aisément en laboratoire, en partie à cause de sa petite taille (environ 60 à 100 g pour la femelle adulte et 90 à 150 g pour le mâle adulte), mais également parce qu'elle se reproduit à l'année en captivité et que

la durée de la gestation n'est que de 14-15 jours (VandeBerg, 1990; Cabana, 2000; Macrini, 2004; VandeBerg et Williams-Blangero, 2010).

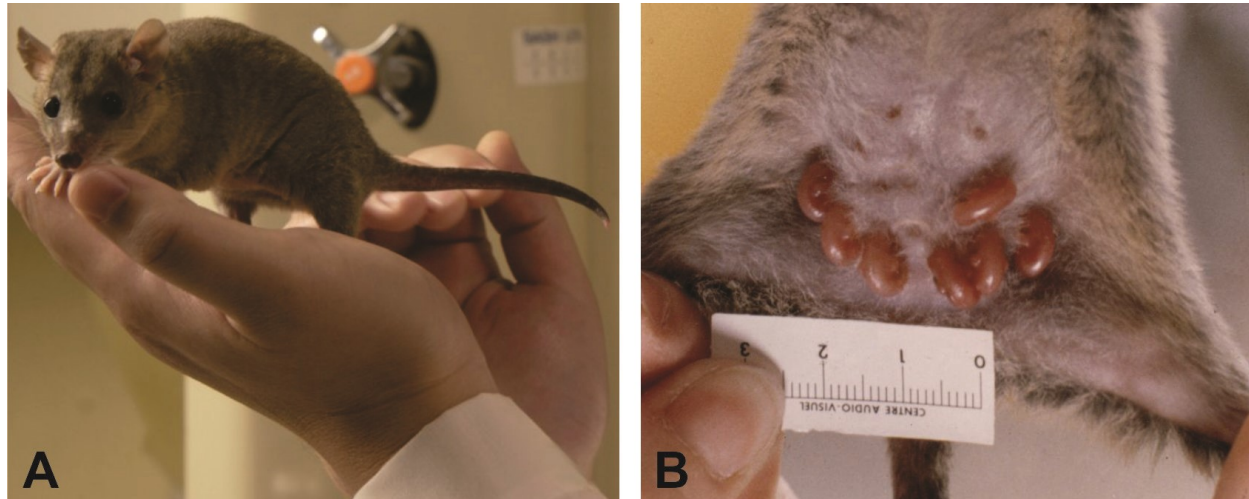


Figure 4. L'opossum *Monodelphis domestica*. A) Opossum adulte. B) Portée de nouveau-nés sur le ventre d'une femelle. Les petits mesurent environ 1 cm à la naissance. Crédit photo A : *Southwest Foundation for Biomedical Research*

Les opossums étant des animaux solitaires, ils sont maintenus dans des cages individuelles à l'animalerie de l'Université de Montréal, à l'exception des petits non sevrés (moins de 2-3 mois) et des adultes choisis pour les accouplements. Les adultes mâles et femelles qui ne sont pas en accouplement sont placés dans des pièces séparées, car la présence du mâle suffit à déclencher l'oestrus de la femelle (Fadem, 1987). Lors des accouplements, un mâle et une femelle sont placés dans une cage munie d'un séparateur amovible et sont gardés dans une pièce prévue à cet effet. Ceci permet aux animaux de s'habituer à la présence de l'autre et cela a pour effet de diminuer les risques d'agression lorsque le séparateur sera enlevé. Celui-ci est laissé en place durant 7 jours avant d'être retiré, puis les couples sont séparés au bout de 4 jours. Le mâle et la femelle sont alors réacheminés dans leur pièce respective. Puisqu'il est impossible de savoir si les femelles qui ont été en période d'accouplement sont gestantes, elles sont observées quotidiennement pendant les

quatorze jours après le retrait du séparateur, et ce durant une semaine, afin de vérifier si des petits sont accrochés aux mamelles (Figure 4B). Le jour de la naissance est appelé P0.

1.2.1 Développement général de l’opossum

Lorsque l’accouplement est réussi, la fertilisation se produit dans les 24h suivantes et la gastrulation a lieu au jour embryonnaire (E) 10 (Mate et al., 1994). C’est alors que débute une organogenèse très rapide car l’embryon naît 4 à 5 jours plus tard avec des systèmes respiratoire, circulatoire et digestif suffisamment développés pour assurer sa survie à l’extérieur du corps de la mère (Mate et al., 1994). À la naissance, l’aspect général de l’opossum est globalement comparable à un embryon de rongeur âgé entre E11.5 et 13 (Figure 5), ou à un embryon humain à 6 à 10 semaines de gestation (Cassidy et al., 1994; Smith, 2001; Lavallée et Pflieger, 2009; VandeBerg et Williams Blangero, 2010). L’opossum nouveau-né est glabre, mesure 10-12 mm de longueur et pèse environ 100 mg. Sa tête est large par rapport au reste de son corps et les yeux et les canaux auditifs ne sont pas encore ouverts. Contrairement à la souris, il possède des MA dont les articulations sont visibles et dont les doigts sont munis de griffes, alors que les membres postérieurs sont à peine plus développés que des bourgeons embryonnaires et sont immobiles (Cassidy et al., 1994; Pflieger et al., 1996). À cet âge, les MA sont composés d’un squelette cartilagineux et de muscles encore très immatures (Barthélémy et Cabana, 2005) mais permettent à l’opossum nouveau-né de grimper en s’accrochant aux poils du ventre de la mère jusqu’à l’atteinte d’une mamelle à laquelle ses lèvres demeurent fusionnées pendant 3 semaines (Cabana, 2000).

Durant environ la première semaine et demi de développement postnatal, les seuls comportements moteurs visibles effectués par le petit sont des mouvements locomoteurs des MA semblables à ceux décrits à la naissance, ainsi que des mouvements du tronc associés aux muscles de la cage thoracique servant à la respiration (Pflieger et al., 1996). Les vibrisses et la fourrure

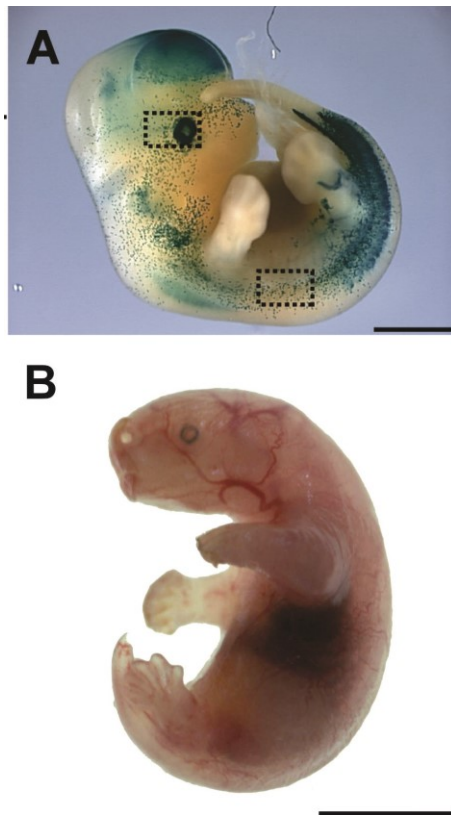


Figure 5. Comparaison du développement morphologique de la souris et de l'opossum. A) Embryon de souris à E12.5. B) Opossum nouveau-né (P0). Même si les deux embryons sont à des âges comparables, les bras, la ceinture pectorale, et la base du crâne sont mieux développés chez l'opossum que chez la souris. Crédits photo A) Silver et al. (2008) B) Stéphanie Lamoureux. Échelle, 2mm

commencent à pousser pendant la 2^e et la 3^e semaine de développement, respectivement (VandeBerg et Williams Blangero, 2010). Durant cette période, l'articulation de la cheville devient flexible et les membres postérieurs commencent à être mobiles. Puis à la 4^e semaine, malgré un mauvais support des pattes arrière et un manque de coordination, le petit peut supporter son poids et se promener seul (Pflieger et al., 1996). C'est au cours de la 5^e semaine que les canaux auditifs et les yeux s'ouvrent, à P30 et à P31-35 respectivement. (Cassidy et al., 1994; Pflieger et al., 1996). À 7 semaines, le jeune opossum a la démarche d'un adulte en plus d'y être morphologiquement semblable (Pflieger et al., 1996). À 2 mois le petit est sevré et la maturité sexuelle est atteinte à 5-6 mois (VandeBerg, 1990).

1.2.2 État du système nerveux à la naissance

Le développement du système nerveux des placentaires et des marsupiaux est similaire sur de nombreux aspects, notamment dans les stades précoces tels que de la neurulation, l'organisation segmentale et la formation de la flexion céphalique au niveau du tronc cérébral (Ashwell, 2010a). Cependant, par rapport aux placentaires, l'évolution a favorisé chez les marsupiaux une légère accélération du développement du système musculo-squelettique des régions brachiales et oro-faciales conjointement à un développement prolongé du système nerveux (Smith, 2001).

1.2.2.1 Le système nerveux central

Chez l'opossum nouveau-né, la ME est très immature, surtout caudalement. Le canal central est allongé verticalement et est entouré d'une zone germinative très épaisse, particulièrement au niveau dorsal (Gingras et Cabana, 1999; Lamoureux et al., 2005; Kitchener et al., 2006). La zone intermédiaire (matière grise présomptive) comprend de petites cellules indifférenciées qui semblent être en processus de migration. La zone marginale (matière blanche présomptive) est particulièrement fine dorsalement et est dépourvue de fibres myélinisées (Gingras et Cabana, 1999; Lamoureux et al., 2005). Les neurones des cornes dorsales ne sont pas bien définis et sont composées de petites cellules, mais les colonnes motrices latérales sont évidentes aux renflements lombaire et cervical (Kitchener et al., 2006; Phan et Pflieger, 2013). En effet, dès la naissance, les motoneurones des deux renflements envoient leurs axones aux muscles des MA et postérieurs, même si ces derniers sont immobiles (Barthélémy et Cabana, 2005). Des afférences primaires pénètrent dans les cornes dorsales, mais celles-ci vont innerver des neurones de la corne ventrale plutôt que ceux des couches superficielles (couches de Rexed I et II) (Knott et al. 1999). Ce n'est

qu'au cours des semaines suivant la naissance que les afférences primaires vont s'étendre dans la corne dorsale (Knott et al. 1999; Kitchener et al., 2006).

Des voies spinales sont également présentes à la naissance. En effet, des projections propriospinales descendantes provenant de neurones cervicaux (couches de Rexed VII-VIII) innervent les niveaux lombosacrés (Cassidy et Cabana, 1993). Les voies sensorielles ascendantes provenant des DRG aux niveaux lombo-sacré et mi-thoracique sont présentes dans la ME, mais n'atteignent les niveaux supraspinaux, notamment le faisceau gracile, que quelques jours après la naissance (Qin et al., 1993).

Au niveau du tronc cérébral, il est possible d'identifier de nombreuses structures telles que la formation réticulée, le noyau de l'olive inférieure, les noyaux des nerfs moteurs crâniens, le noyau vestibulaire latéral et le noyau sensoriel du trijumeau (Wang et al., 1992; Swanson et al., 1999; Pflieger et Cabana, 1996). Au niveau mésencéphalique, le tectum et le noyau rouge ne sont pas encore bien différenciés, mais il est possible de discerner la substance noire et le faisceau longitudinal médial (Wang et al., 1992).

Chez les marsupiaux, certaines composantes de la formation réticulée se forment de façon précoce et elles sont susceptibles de jouer un rôle dans le contrôle des mouvements des MA à la naissance (Ashwell, 2010b; Adadja et al., 2013). En effet, chez l'opossum nouveau-né, les projections descendantes de plusieurs noyaux de la formation réticulée médullaire et pontique atteignent la ME, notamment celles des noyaux ventral et dorsal de la formation réticulée médullaire, des noyaux gigantocellulaire et latéral paragigantocellulaire ainsi que du noyau du raphé caudal et du noyau réticulaire du pont (Wang et al., 1992). D'autres structures dont les axones sont envoyés vers la ME comprennent le noyau rétroambiguus, le noyau spinal du

trijumeau, le présumé locus coeruleus, le noyau vestibulaire latéral et le noyau interstitiel du faisceau longitudinal médian (Wang et al., 1992; Pflieger et Cabana, 1996).

Finalement, le prosencéphale est tout particulièrement immature à la naissance. Le néocortex est très peu développé et consiste en un feuillet composé de deux couches cellulaires (Saunders et al., 1989; Wang et al., 1992; Puzolo and Mallamaci, 2010), et un seul noyau est identifiable dans l'hypothalamus latéral (Wang et al., 1992). Le cervelet est pratiquement inexistant à cet âge. En effet, les cellules des lèvres rhombiques n'ont pas encore migré de la couche germinale et les cellules de Purkinje ne sont pas différenciées (Pflieger et Cabana, 1996).

1.2.2.2 Les sens qui influencent le contrôle moteur chez le nouveau-né

Les mouvements des membres des tétrapodes sont générés par des réseaux neuronaux spinaux (CPG; revues dans Kiehn, 2006; Rossignol et al., 2006). La question n'a pas été étudiée chez les marsupiaux nouveau-nés mais de tels réseaux, sous une forme immature, doivent être à l'origine des mouvements des MA qui permettent au nouveau-né marsupial de se mouvoir du sinus urogénital jusqu'au marsupium. Toutefois, pour que la tétine soit atteinte et pour déclencher les comportements d'attache, il faut que des inputs sensoriels influencent l'activité de ces réseaux. Or, la nature de ces stimuli est encore mal définie.

À la naissance, il est peu probable que les systèmes visuel et auditif agissent sur les comportements de l'opossum nouveau-né. En effet, les yeux des opossums sont couverts de peau et ne s'ouvrent que vers P35 (Cassidy et al., 1994). De plus, les fibres de la rétine n'atteignent le chiasma optique que vers P3 et les axones des collicules supérieurs ne font contact avec la ME cervicale qu'à partir de P16 (Wang et al., 1992; Taylor et Guillery, 1994). Par ailleurs, le méat

auditif ne s'ouvre qu'à environ P30 (Cassidy et al., 1994), les osselets de l'oreille moyenne sont incomplets et cartilagineux, et il faut attendre P24 et P28-29 avant de pouvoir enregistrer des réponses physiologiques au niveau des collicules inférieurs et dans le tronc cérébral respectivement (Reimer, 1996; Aitkin et al., 1997; Sanchez-Villagra et al., 2002). La question de l'implication de l'équilibre (système vestibulaire) et de l'olfaction lors de la naissance est encore discutée. Dans les deux cas, des observations soutiennent l'implication de ces sens alors que d'autres ne la supportent pas.

Dans sa description de la naissance chez l'opossum d'Amérique du Nord, *Didelphis virginiana*, Hartmann (1920) remarque que les petits adoptent une posture anti-gravitaire et tendent à grimper vers le haut sur le ventre de la mère. Le phénomène est également observé chez le quokka *Setonix brachyurus* (Cannon et al. 1976) et d'autres espèces de marsupiaux (Gemmell et al. 2002). Différentes études anatomiques montrent que des organes sensoriels (la macule utriculaire notamment) pourraient être fonctionnels dès la naissance et que les connexions nerveuses reliant ces organes et la ME sont en place dès ou peu après la naissance (Pflieger et Cabana, 1996; McCluskey et al., 2008). D'ailleurs, sur des préparations *in vitro*, la stimulation électrique de la région des noyaux vestibulaires peut induire des mouvements des MA à une intensité de stimulation relativement faible (Adadja et al., 2013). A contrario, les nouveau-nés de différents marsupiaux ne montrent pas de réflexes vestibulaires avant plusieurs jours postnataux (Pellis et al., 1992; Cassidy et al., 1994). Récemment, une série d'expériences visant à tester la fonctionnalité du système vestibulaire chez l'opossum nouveau-né à l'aide de stimulations mécaniques, autant *in vivo* qu'*in vitro*, suggère que les organes vestibulaires périphériques seraient encore trop immatures pour guider l'opossum à la naissance (Lanthier, 2017). L'hypothèse la plus probable pour expliquer les comportements antigravitaires des marsupiaux serait que l'arrière-train

immobile des nouveau-nés agirait comme un lest et orienterait passivement la tête vers le haut, il est toutefois possible que des propriocepteurs cervicaux influencent plus activement ce redressement (Larsell et al., 1935; Cannon et al. 1976)

Pour l'olfaction, plusieurs études histologiques portant sur l'épithélium olfactif et le nerf olfactif suggèrent que ces structures sont suffisamment matures chez les marsupiaux nouveau-nés pour réagir à la présence de composés volatils et transmettre des influx nerveux au bulbe olfactif (Chuah et al., 1997; Shapiro et al., 1997; Schneider et al., 2009) Une étude comportementale effectuée chez le wallaby montre par ailleurs que les petits sont attirés par des composés volatils présents dans la poche de la mère (Schneider et al., 2009). Toutefois, chez l'opossum nouveau-né en préparation *in vitro*, il faut de très fortes stimulations électriques des bulbes olfactifs pour pouvoir engendrer du mouvement des MA, des stimulations non physiologiques, ce qui ne supporte pas l'idée que les projections des bulbes olfactifs vers les régions motrices sont développées (Adadja et al., 2013). Différentes études anatomiques confirment le manque de maturité des projections secondaires olfactives chez des marsupiaux (Ashwell et al., 2008; Hour, 2017). Les observations montrant une réponse comportementale aux composés volatils chez le wallaby nouveau-né pourraient être expliquées par d'autres sens chimiques. Il n'existe toutefois pas d'étude suffisamment approfondie du système gustatif des marsupiaux pour pouvoir inférer si ce sens peut être impliqué dans le contrôle des comportements moteurs précoces.

Un autre système qui pourrait influencer les comportements moteurs des nouveau-nés marsupiaux est le système somatosensoriel, dont les principales sensations extéroceptives associées sont la mécanosensation, la nociception et la thermosensation (chapitre 1). En effet, Langworthy (1928) a observé chez l'opossum d'Amérique du Nord que les petits sont sensibles aux stimuli cutanés. Par exemple, lors d'une pression sur le museau, ceux-ci tournent la tête du

côté stimulé et ils enroulent leur queue autour d'un objet lors d'un contact. De plus, les petits se déplacent vers des sources de chaleur et évitent le froid, ce qui amène l'hypothèse que le petit pourrait être attiré par la chaleur du marsupium.

Au niveau de la tête, les sens somesthésiques céphaliques sont liés au système du trijumeau, qui sera décrit plus en détails dans la section suivante (1.3). Globalement, des études anatomiques en microscopie suggèrent que le système trigéminal pourrait être au moins partiellement fonctionnel à la naissance chez les marsupiaux puisque tous ses noyaux sensoriels sont visibles dans le tronc cérébral à cet âge (Waite et al., 1994; Ashwell, 2015). De plus, chez le wallaby et l'opossum nouveau-nés, les neurones ganglionnaires du trijumeau envoient leur prolongement périphérique vers le derme, l'épiderme, les papilles dermiques et les follicules des futures vibrisses où se trouvent des cellules de Merkel, un type de récepteur mécanosensible (Jones et Munger, 1985; Waite et al., 1994; Adadja et al., 2013). Puisque chez trois autres espèces de marsupiaux nouveau-nés, le chat marsupial du Nord, le phalanger-renard et bandicoot brun du Nord, les cellules de Merkel ont été retrouvées en forte densité au niveau de la bouche par rapport aux autres régions du corps, il est donc probable que ces récepteurs servent lors de la naissance (Gemmell et al., 1988)

En préparations *in vitro* d'opossums nouveau-nés, la stimulation électrique du 5G induit des mouvements des MA à des intensités relativement faibles, comparables à celles nécessaires pour produire des mouvements similaires en stimulant la ME. Cela suggère fortement que le trijumeau joue un rôle important dans les comportements moteurs précoces chez les marsupiaux (Adadja et al., 2013). Des pressions mécaniques appliquées sur la face de l'opossum nouveau-né en préparation *in vitro* induisent des mouvements bilatéraux et synchronisés des membres, et ces réponses pourraient être médiées par les cellules de Merkel présentes dans l'épiderme du museau

(Desmarais et al., 2016). La fonction mécanosensorielle du trijumeau est donc fonctionnelle chez l'opossum à la naissance, et peut moduler son activité motrice, voire déclencher l'attachement, mais elle ne suffit pas à expliquer comment il trouve les télines.

1.3 Trijumeau chez les mammifères

Associé au plus volumineux des nerfs crâniens (5^e nerf crânien), le système du trijumeau est responsable de l'innervation de la face (Capra et Dessem, 1992). Le nerf trijumeau doit son nom au fait qu'il se subdivise en trois branches – ophtalmique, maxillaire, et mandibulaire – en périphérie du ganglion trigéminal (semilunaire, ou de Gasser; Figure 6). Ce ganglion contient les corps cellulaires des neurones sensoriels dont les prolongements empruntent les trois branches et le nerf. La branche mandibulaire contient en plus une composante branchiomotrice formée par les axones des motoneurones du noyau moteur du trijumeau qui innervent les muscles responsables de la mastication, le zygomandibulaire, le mylohyoïde, le ventre antérieur du digastrique et les muscles tenseurs du tympan et du voile du palais (Shankland, 2000). La portion sensorielle du trijumeau est toutefois prédominante en nombre de fibres nerveuses et fera l'objet de ce chapitre.

1.3.1 Organisation générale chez l'adulte

La composante somatosensorielle relaie des inputs en provenance de la face, du scalp, des yeux, de la langue, des dents, des gencives, des muqueuses des sinus, du nez et de la bouche, de la membrane tympanique et des méninges, et des muscles masticateurs (proprioception) (Kandel,

2012, ch. 22). Différentes modalités sensorielles y sont associées, mais les plus étudiées sont la mécanoeption, la nociception et la thermoception.

Comme dit plus haut, les corps cellulaires à l'origine des afférences primaires sont localisés dans le ganglion trigéminal (5G) qui se trouve dans le cavum de Meckel situé à la base du crâne. En périphérie du 5G, le nerf se divise pour former les branches ophtalmique, maxillaire et mandibulaire qui innervent respectivement le haut, l'avant et le bas de la tête. Les afférences sensorielles entrent dans le tronc cérébral par la surface ventrale du pont et rejoignent ensuite les noyaux du complexe sensoriel du trijumeau qui forment une colonne plus ou moins continue de la corne dorsale de la ME jusqu'au mésencéphale (Shankland, 2000). Un plus faible contingent d'afférences primaires trigéminales innerve d'autres cibles, notamment le noyau supratrigeminal, l'intertrigeminal, le solitaire, le vestibulaire, le cunéiforme, et aussi des portions de la formation réticulée, le cervelet et la ME cervicale (Capra et Dessem, 1992).

Chez les monotrèmes, les marsupiaux et les placentaires, la colonne formée par les noyaux sensoriels du trijumeau comprend le mésencéphalique (Vmes), le principal (Vpr) et le spinal (Vsp) du trijumeau, lui-même subdivisé en pars oralis (Vo), interpolaris (Vi) et caudalis (Vc) (Figure 6; Capra et Dessem, 1992; Waite et al., 1994; Shankland, 2000; Ashwell et al., 2006). Les afférences primaires se distribuent de façon somatotopique dans le 5G et selon l'axe rostrocaudal dans ces noyaux (l'avant de la tête - nez ou museau - étant représentée rostralement) (Marfurt, 1981; Arvidsson, 1982; Shigenaga et al., 1986; Borsook et al., 2003). Certains auteurs considèrent que le Vpr et le Vsp seulement font partie du complexe de noyaux sensoriel du trijumeau, car le Vmes constitue un cas un peu particulier. En effet, les neurones du Vmes ont un corps cellulaire arrondi comme celui des DRG, ils sont aussi pseudo-unipolaires et possèdent un prolongement

périphérique servant de récepteur; ils agissent comme des neurones sensoriels primaires à l'origine notamment des afférences périodontales et celles des fuseaux neuromusculaires de muscles masticateurs (Gottlieb et al., 1984).

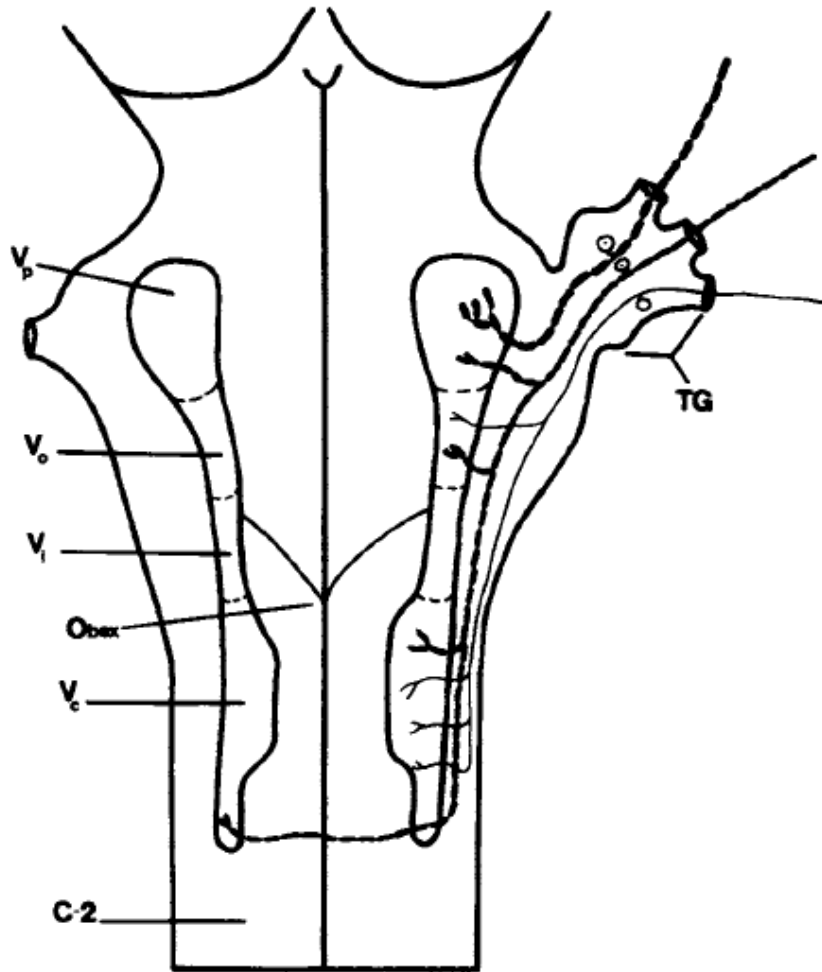


Figure 6. Schéma du tronc cérébral montrant le complexe de noyaux sensoriels du trijumeau. À gauche, suivant l'axe rostro caudal : le noyau principal (V_p) et les subdivisions du noyau spinal (oralis (V_o), interpolaris (V_i), caudalis (V_c)) du trijumeau. À droite, illustration du trajet de certaines afférences primaires provenant du ganglion trigéminal (TG). Les fibres de petit calibre (non myélinisées) sont surtout issues de la branche mandibulaire et se distribuent sur toute la longueur du complexe sensoriel du trijumeau, mais tout particulièrement au V_c. Les fibres issues des branches ophtalmiques et maxillaires sont généralement plus myélinisées et de plus gros calibre. Elles atteignent aussi différentes régions du complexe sensoriel. Tiré de Capra et Dessem (1992).

Le Vc est la partie la plus caudale du Vsp. Il présente une organisation laminaire avec une couche marginale, gélatineuse et magnocellulaire semblable à celle de la ME, ce qui a conduit à le concevoir comme l'unique région responsable de la sensation de la température et de la douleur (Olszewsky, 1950). En effet, en grande partie des fibres non myélinisées et de petit calibre font synapse principalement au niveau du Vc (Tashiro et al., 1984; Sugimoto et al., 1997; Pajot et al., 2000). Par contraste, les fibres de gros calibre et fortement myélinisées, qui sont le plus souvent issues des branches ophtalmique et maxillaire, se terminent surtout dans le Vpr, Vo et Vi (Tashiro et al., 1984; Sugimoto et al., 1997).

Cependant, les afférences douloureuses ne seraient pas seulement acheminées au Vc, mais bien à tous les noyaux sensoriels du trijumeau à l'exception du Vmes (Young, 1982). Par exemple, les fibres cutanées nociceptives de la région périorale sont en grande partie reçues par le Vc, mais pas les fibres nociceptives provenant de la cavité orale, qui seraient dirigées ailleurs dans le complexe sensoriel du trijumeau (Pajot et al., 2000). En fait, les sensations nociceptives de l'intérieur de la bouche seraient perçues davantage par le Vo et le Vpr, mais peu ou pas par le Vc (Young et al., 1981; Azerad et al., 1982; Young 1982). Par ailleurs, la perception de la température ne serait acheminée qu'à la couche marginale du Vc, et pas du tout dans les autres régions (Dostrovsky et Hellon, 1978).

1.3.2 Développement

Le développement système du trijumeau chez les mammifères est bien documenté dans la littérature, tout particulièrement chez le rat embryonnaire. Tel que vu dans la section 1.2, tous les mammifères n'ont pas le même niveau de développement à la naissance, mais pour une taille

embryonnaire donnée, l'état de développement anatomique du système du trijumeau et celui des structures peaucièrès qu'il innerve sont globalement assez similaires chez les placentaires, les marsupiaux et les monotrèmes (Ashwell, 2015).

Le développement du trijumeau s'effectue assez rapidement chez le rat : dans le 5G, la neurogenèse débute vers E9.5 et se poursuit jusqu'à environ E15, mais la plupart des neurones ganglionnaires ont complété leur division finale entre E11 et E13 (Forbes et Welt 1981; Rhoades et al., 1991). À E11, le 5G est essentiellement un amas de cellules mitotiques dont les prolongements sont terminés par des cônes de croissance, alors qu'à E12 il a l'apparence d'une masse distincte située entre l'œil et le myélencéphale avec des projections commençant à s'étendre vers la périphérie (Erzurumlu et Killackey, 1983). Lors de la neurogenèse du ganglion, les neurones les plus larges se différencient en premier, suivis des moyens et des petits neurones (Forbes et Welt 1981).

Toujours chez le rat, les prolongements centraux issus du 5G atteignent le tronc cérébral à E13, alors que les neurones des noyaux du complexe sensoriel débutent tout juste leur différenciation (Erzurumlu et Killackey, 1983; Erzurumlu and Jhaveri, 1992). En effet, les neurones du Vpr, Vo, Vi et Vc se forment un peu plus tard, entre E13 et E16 (Altman et Bayer, 1980a, b, c). Néanmoins, les neurones du Vmes sont générés à peu près au même moment que ceux du 5G, vers E11 ou avant (Altman et Bayer, 1980c). Quant aux prolongements périphériques du 5G, ils atteignent également leur cible à E13 alors que les follicules des futures vibrisses ne sont réellement visibles qu'à partir de E14 (Erzurumlu et Killackey, 1983; Erzurumlu and Jhaveri, 1992). Des stimulations du 5G sur des préparations *in vitro* de ratons périnataux suggèrent que les synapses entre afférences et neurones du Vpr commencent à être fonctionnelles aux environs de E15 et se renforcent par la suite (Waite et al., 2000).

Chez les monotrèmes et la plupart des marsupiaux à la naissance, le faisceau du trijumeau spinal est au moins partiellement développé dans le tronc cérébral et tous les noyaux du complexe sensoriel peuvent être distingués (Ashwell 2015). Chez le wallaby nouveau-né, les fibres nerveuses rejoignent l'épiderme et les follicules des vibrisses en développement; les fibres des afférences primaires, elles, pénètrent dans le Vpr, Vo, Vi, Vc et également dans le Vmes (Waite et al., 1994).

La stimulation des zones d'innervation du trijumeau peut entraîner des réflexes moteurs chez les animaux adultes comme le chat ou la lamproie (Sherrington, 1917; Viana di Prisco et al., 1997), mais elle peut aussi entraîner des comportements réflexes moteurs très tôt dans le développement. En effet, la stimulation unilatérale du nerf trijumeau (5N) engendre chez le rat néonatal des potentiels post-synaptiques bilatéralement dans les motoneurones lombaires (Vinay et al., 1995). De plus, chez le têtard de xénope (*X. laevis*; Boothby et Roberts, 1995; Buhl et al., 2012) la stimulation de la peau de la face engendre des mouvements de nage. Chez le nouveau-né d'opossum (*M. domestica*), une telle stimulation engendre des mouvements des MA similaires à ceux exprimés durant la locomotion (Desmarais et al., 2016). Il s'agit donc d'un système fonctionnel à des stades précoces de développement chez un bon nombre de vertébrés.

1.4 Problématique

Puisque la stimulation mécanique des zones d'innervation du trijumeau engendre des mouvements des MA chez l'opossum nouveau-né (Desmarais et al., 2016) et que ce nerf comprend des fibres thermosensibles (au moins chez l'adulte), il paraît probable que des variations de température détectées à ce niveau puissent également influencer la motricité des petits à la naissance. Même si plusieurs auteurs ont remarqué que les nouveau-nés marsupiaux

montrent une certaine sensibilité à la température (Langworthy, 1928; Nicholls et al., 1990; Ho, 1997) cette hypothèse n'a pas été explorée jusqu'à ce jour.

Les quelques études qui se penchent sur le développement de la thermosensation chez les embryons de mammifères sont soit anatomiques, soit effectuées sur des cellules en culture (voir section 1.3.2), mais il n'en existe aucune, à notre connaissance, sur son développement fonctionnel et systémique à des stades embryonnaires. L'absence de telles études s'explique en partie du fait que la température dans l'utérus est stable, et le fœtus n'est donc pas exposé à des changements thermiques de son milieu avant la naissance. Or, chez les marsupiaux, la température pourrait jouer un rôle important lors de la naissance des petits, et l'étude développementale de la thermosensation chez ces animaux pourrait mener à une meilleure compréhension globale du développement somatosensoriel chez les mammifères.

Ainsi, nous sommes partis de l'hypothèse que les nouveau-nés d'opossum sont sensibles à la chaleur et que celle-ci peut les attirer vers les mamelles sur le ventre de la mère. Selon notre hypothèse, le chaud aurait donc un effet attractif qui se manifesterait par l'induction de mouvements des MA. Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié comment des stimulations céphaliques utilisant de larges gammes de températures induisent des réponses motrices sur des préparations *in vitro* d'opossums âgés de P0 à P4.

2. Article scientifique présenté dans ce travail

Edith Corriveau-Parenteau, Ariane Beauvais, Annie Angers, Jean-François Pflieger

Influence of temperature on motor behaviors of newborn opossums, *Monodelphis domestica*: an *in vitro* study

Article en preparation

Author contributions

E.C.-P., and J.-F.P. designed the protocols; E.C.-P., A.B. and A.A., performed the experiments; E.C.-P. A.A., and J.-F.P. analyzed the data; E.C.-P. and J.-F.P. wrote the paper.

This work was supported by a Grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (#312015) to J.-F.P.

Influence of temperature on motor behaviors in newborn opossums, (*Monodelphis domestica*): an *in vitro* study

Authors: Edith Corriveau-Parenteau, Ariane Beauvais, Annie Angers, Jean-François Pflieger

Affiliations: Département de Sciences biologiques, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montréal (QC) Canada, H3C 317

Corresponding author:

Jean-François Pflieger

Département de Sciences biologiques, Université de Montréal

C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montréal (QC) Canada

H3C 317

Acknowledgements: The authors are grateful to Sophie Breton, for the use of her PCR and electrophoresis equipment. We thank Nisrine Hafidi, Alexis Oretaga-Sheehy and Lysianne Papineau for their technical assistance. We would also like to thank Thérèse Cabana and Frédéric Bretzner for their comments on this manuscript. This project was part of the requirements for E.C.-P.'s M.Sc. degree.

Abstract

External thermosensation is crucial to regulate animal behavior and homeostasis. Changes in external temperature are detected by nerve fibres located in the skin and mucosae that express thermosensitive receptors like TRPV1, activated by hot temperatures and capsaicin, or TRPM8, sensible to cold temperatures and menthol. Like other marsupials at birth, the opossum *Monodelphis domestica* performs alternate and rhythmic movements with its forelimbs (FL), but sensory modalities influencing FL movements are yet unknown. Thus, this study investigates if temperature could play a role in the control of these movements in the newborn opossum. It is possible in *in vitro* preparations of the neuraxis with skin and FL intact, to induce FL movements by facial pressure on the snout. Herein, we applied stimulations consisting of puff ejections of cold, neutral (bath temperature) and hot liquid directed towards the face, and FL responses were observed under a microscope or triceps muscle activity was recorded. Cold temperatures always induced FL movements or triceps contractions, but neutral and hot temperatures were less potent to do so. Sections of the trigeminal nerve and removal of the facial skin only diminished responses to cold stimulations while those to hot and neutral stimulations were almost abolished. Immunohistochemistry and RT-PCR experiments show that TRPM8 is not expressed in neonatal opossum. Overall, the present study demonstrates that cold, but not hot, perception influences motor behaviors in the newborn, and that the receptor involved is not TRPM8. The receptors which mediates this perception remains to be discovered.

Keyowrds: Thermosensation, trigeminal system, TRPM8, development, motor behaviors.

Introduction

Changes in external temperature activate thermosensible molecular receptors on peripheral nerve endings of sensory neurons located in spinal dorsal root ganglia (DRG) and cephalic ganglia. Over the last 20 years, many studies have focused on the identification and physiological properties of these receptors and they revealed that non-selective cation channels of the transient receptor potential (TRP) family is the main group of temperature-sensing receptors (reviews in Schepers & Ringkamp, 2008; Vriens et al., 2014). ThermoTRPs are activated by changes in temperature but also by chemical compounds, and those who have been best characterized so far are the heat and capsaicine receptor TRPV1, and the cold and menthol receptor TRPM8 (Caterina et al., 1997; McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002b). Other known mammalian thermoTRPs include TRPV3-4, TRPM3 and TRPA1 (Güler et al., 2002; Peier et al., 2002a; Watanabe et al., 2002; Story et al., 2003; Vriens et al., 2011), but only TRPM8 was shown without ambiguity to have major role in temperature sensing *in vivo* (Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007; Dhaka et al., 2007). The properties of these channels have been well documented at cellular levels, but less is known about the encoding of temperature at network levels.

The few studies who address how the central nervous system (CNS) processes thermosensory information were performed on mature animal models (Pogorzala et al., 2013; Ran et al., 2016; Yarmolinsky et al., 2016). Therefore, little is known about the development of thermosensation in mammals. During mouse embryonic development, the expression of TRPV1 in DRG cells starts around 12.5 days of gestation (E12.5), followed by expression of TRPM8 a few days later, around E18.5 (Hjerling-Leffler et al., 2007). It is unknown when thermosensitive pathways start being functional, and if they have any observable behavioral effects at these ages. In rat neonates, it was shown by Blivis et al. (2007) that heat can induce locomotor-like activity in

the spinal cord, and it was further demonstrated by Mandadi et al. (2009) that segmental sensory afferents expressing TRPM8 and TRPV1 have an influence on the activity of spinal networks generating locomotor rhythms (central pattern generators, CPGs).

Therefore, upon our ongoing research on sensorimotor development in mammals, we investigate if thermosensory pathways are functional at early stages in development. For that, we use the grey short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*) as a model. Like other marsupials, the newborn is especially immature, approximately equivalent to E12-13 rat or mouse embryos (Smith, 2001; VandeBerg & Williams Blangero, 2010). At birth, it must perform alternate and rhythmic movements with its forelimbs (FL) to climb and reach a nipple where it attaches to pursue its development. Sensory inputs are necessary to trigger these movements and induce the attachment to the teat, but their nature is still uncertain. However, stimulation of the trigeminal system, which relay facial mechanosensory, nociceptive and thermosensory inputs in adult mammals (reviews in Capra & Dessem, 1992; Shankland, 2000), have been previously shown to exerts a strong drive on motor behaviors in the newborn opossum (Adadja et al., 2013; Desmarais et al., 2010).

In the present study, we use *in vitro* preparations of newborn opossums to evaluate the effect of thermal stimulation on FL motor responses. The small size and immaturity of the neonatal opossum allows us to perform *in vitro* preparations with brainstem and spinal cord left in the carcass with FL and tail attached (Lavallée & Pflieger, 2009). These preparations allow mechanical, pharmacological or electrical stimulations of the skin or other sensory organs while recording FL responses. Our working hypothesis was that warm temperatures should induce FL movements aiming at reaching the warmth of the nipples on the mother's belly. Stimulation consisted of puff ejections of cooled, warmed or bath temperature solution, on the skin of the head.

Motor responses were identified either as FL movements or triceps muscles contractions (electromyography, EMG). The results show that cold stimulations steadily induce motor responses, while bath and hot temperatures do so far less regularly. Complete transections of the trigeminal nerve (5N) diminished the intensity of motor responses to cold, supporting a role for the trigeminal system in mediating thermosensation. RT-PCR and immunohistochemistry experiments show that TRPM8 is not expressed before postnatal day 13 (P13), suggesting that it is not involved in thermosensation in the newborn opossum. This study thus demonstrates that newborn opossums are more responsive to cold temperature. Preliminary results have been published in abstract form (Corriveau-Parenteau et al., 2016a, b).

Material and Methods

Animal care

A colony of Gray short tailed opossums (*Monodelphis domestica*) is maintained at the institution's animal facility according to the guidelines developed initially by Fadem et al. (1982) (for further details on animal care and breeding, see VandeBerg and Williams-Blangero, 2010; Desmarais et al., 2016). The protocol follows the guidelines of the National Committee for Animal Care and was approved by the University animal ethics committee.

In vitro preparations

Both male and female opossums (n=48) aged from P0 (day of birth) to P4 were deeply anesthetised by hypothermia before being eviscerated with microscissors. Hypothermia is used because the newborn opossums are unable to thermoregulate, and it makes them quickly unresponsive to stimulations. The specimens were then pinned dorsal side up on a Sylgard-lined petri dish filled with a physiological solution (NaCl 125 mM, KCl 3 mM, NaHCO₃ 25 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2mM and Glucose 15 mM; oxygenated with 95% O₂/5% CO₂; pH 7.4; adapted from Nicholls et al., 1990; Stewart et al., 1991). Except where specified otherwise, the bath was continually renewed with oxygenated solution at room temperature (20-22°C) during dissection and experimentation. Under a surgical microscope (Olympus sz61), the skin was removed from over the frontal cartilage to the mid-thoracic level of the vertebral column. A craniotomy and a laminectomy were performed to expose the neuraxis and cerebral hemispheres were dissected out. The hindquarters and tail were kept attached, covered with skin. As much skin as possible was left on the snout and chin. The skin covering the neck and the FL was left intact for the experiments consisting of the observation of the FL movements (Fig. 1A), but it was removed for the triceps EMG experiments except over the forepaw extremities, as its removal cannot be done without damage to the underlying tissues (Fig. 2A). The specimens were left unstimulated for 1h30 to 2h before the beginning of experiments.

Stimulations

A stimulation consisted of the manual ejection of a small volume (0.1-0.3 cc) of physiological solution directed towards the front of the face with a syringe (1cc; needle calibre 18g). During a

typical set of experiment, every specimen was stimulated 10 times at a given temperature, with 40s-120s interval between the stimulations, before testing another temperature range. In most experiments, the temperatures tested were approximately 4-8°C for cold stimulations, 20-22°C for neutral (bath temperature) stimulations and 43-48°C for hot stimulations. Exceptions to this are specified in the text. For neutral stimulations, the solution was taken directly from the bath without disturbing the specimen, while cold and hot solutions were kept separately in beakers placed either on ice or over a heating plate. The temperature of bath and stimulating solutions was monitored with thermometers.

Forelimbs movements

34 specimens were pinned in the Sylgard-lined petri dish with pins as described above, and FL were free to move. FL responses to stimulations were observed visually under the surgical microscope and described either as no response or motor response. The latter were further classified as uncoordinated (extensions of one or both FL without obvious coordination; Fig. 1B, lower rows of the right panel; Video 1) or rhythmic (locomotor-like, alternate extensions of the left and right FL; Fig. 1A, upper rows of the right panel; Video 2). A digital camera (Micropublisher 3.3 RTV; Qimaging) was mounted on the surgical microscope and connected to a computer to allow video recording (12.8 frames per second) with Image-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics).

Electrophysiological recordings of triceps muscle

Because of the opossum's small size and immaturity at birth, it is impossible to observe FL movement while recording FL muscular activity. Therefore, we used additional *in vitro* preparations to record triceps activity. 14 specimens (n=14) were tightly pinned to the dish in order to minimize movements of the head, the body and the FL. The skin was removed on the neck and both FL before a Teflon-coated silver wire (wire diameter: 76.2 μm ; total diameter: 139.7 μm ; A-M Systems Inc) was inserted in a *triceps brachii* muscle (Fig. 2A). The electrode was maintained in place by a small piece of Teflon tape pressed over the arm. We attempted to record activity from both triceps in all specimens, but due to the small size of the arms (diameter < 1.5mm) and immaturity of tissues, it was not always possible to keep the electrode inserted in both muscles or to record signal from the two electrodes. Each electrode was connected to high impedance modules (HZP, Grass). An artefact marking the start of the stimulation was generated by the experimenter with a pedal (Linemaster Switch Corporation) (see Fig. 2B). The signals from the electrodes and the pedal were amplified (x10; CP511, Grass Technologies amplifiers) and filtered (bandwidth: 3 Hz-3 kHz) before being digitized (Digidata 1322A, Axon Instruments) and recorded at a sampling rate of 11.1 kHz with Clampex 9.2 (Axon Instruments). Recorded files were saved on disk for future analysis.

The EMG traces were rectified, and the sampling rate reduced to 0.1 KHz using Clampfit 10.6 (Axon Instruments). The averaged baseline trace, as measured over 7-10 s before stimulation, was adjusted at 0 V. The latency and amplitude of the responses were measured on the resulting trace with the same software. A response consisted of a positive trace deviation over 4.5x the average trace level until it declined under this threshold for at least 3 s (Fig. 2B). The latency is

measured from the peak of the artefact to the onset of the response, and the amplitude is the area under the trace over the response duration (Fig. 2B).

Statistical analysis

In FL observation movements experiments, the percentage of motor responses and of rhythmic responses obtained following stimulations at a given temperature for each specimen was averaged before pooling of the results obtained for all specimens (Table 2). For electrophysiology, responses amplitude for a recorded muscle were first normalized using the maximal response obtained for this muscle over the whole series of stimulations as 100%. Percentages were then averaged for this muscle before pooling with data from other muscles. The results are given as mean \pm s.e.m.

To determine if the values followed a Gaussian distribution, a D'Agostino and Pearson normality test was performed systematically before statistical testing. As data rarely followed a normal distribution, non-parametric statistical tests were applied. For comparison of multiple items (ANOVAs), a Friedman test was used for paired values and a Kruskal-Wallis test for unpaired ones; in both cases, the tests were followed by a Dunn's multiple comparison test to compare the rank of the items. For comparison of two items, a Wilcoxon test was used for paired values and a Kolmogorov-Smirnov test for unpaired ones. Table 3 provides a complete overview of the tests performed for the different experiments. Statistical analyses were done using Prism 6 (GraphPad). All figures were designed with CorelDraw X8 software.

Immunohistochemistry and RT-PCR

These immunohistochemistry and RT-PCR experiments were first designed to assess if both TRPM8 and TRPV1 receptors are expressed in the head tissues of the newborn opossums. However, it was impossible to do so for TRPV1, as no homologue has yet been identified in marsupials. Therefore, our experiments focused on TRPM8 only.

Specimens aged P0/P1 (n=4), P5 (n=3), P9 (n=3), P13/14 (n=5) were deeply anesthetized by hypothermia and decapitated. The heads were immersed in paraformaldehyde 4% for 48h followed by sucrose 30% for 24-48h. They were then embedded in optimal cutting compound Tissue Tek (Sakura) and sectioned transversally at 20 μ m with a cryostat (Leica CM3050S). The sections were collected on Superfrost slides (Fisher) and allowed to dry overnight before being washed with a 0.05 M Tris buffered solution (TBST, 15% saline, 3% Triton X-100, pH 7.4) containing 5% Normal goat serum for 1h at room temperature. They were then incubated with primary anti-TRPM8 polyclonal antibodies produced in rabbit (1:100 in TBST, Santa-Cruz Biotechnologies D-25) for 24h at 4°C. After rinsing with TBST, the sections were incubated with a goat anti-rabbit IgG H&L secondary antibody coupled with Alexa fluor 488 (1:400 in TBST; Santa-Cruz Biotechnologies 516606 or Abcam ab150077) for 2-3h at room temperature. The sections were rinsed thrice with TBST before being mounted with a coverslip using Fluoromount G (Southern Biotech) as mounting medium. They were observed with a fluorescence microscope (Nikon ECLIPSE 50i) using FITC filter. Photos were acquired with a digital camera (Nikon DS-2Mv) and saved on a computer using NIS-Elements F3.0 (Nikon) imaging software. When needed, adjustment of contrast, luminosity and color was done using Corel PhotoPaint X8. Figures were designed with Corel Draw X8.

Additional specimens aged P0/1 (n=3), P8 (n=1) and P11/12 (n=3) were deeply anesthetized by hypothermia and decapitated, and the heads were collected. It has been demonstrated that spermatozoa express TRPM8 in Vertebrates (De Blas et al., 2009; Martínez-López et al., 2011; Majhi et al., 2015), so one adult male was deeply anesthetized by isoflurane, decapitated and testis were collected to serve as positive control. The heads and testis were immersed in extraction buffer (RLT; Qiagen) and homogenized with a rotor-stator. Tissues were then treated with proteinase K and DNase I prior to RNA isolation with RNeasy mini kit (Qiagen). Total RNA was then used for reverse transcription to cDNA using Superscript IV (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The resulting cDNA was then amplified by PCR with specific primers for TRPM8 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Table 1). PCR consisted of 5 minutes preheating (94°C), followed by 37 cycles of amplification (94°C for 30 s, 56°C (GAPDH) or 58°C (TRPM8) for 30 s, and 72 °C for 30 s) and ended with a final extension at 72°C for 10 minutes. Migration was done on a 1% agarose gel for 30 minutes at 120 V. A photo was taken using a digital camera (Fusion FX, Vilber Lourmat, MBI Lab Equipment) and analyzed with FusionCapt Advance Solo 4 16.08a software.

Results

Forelimbs movements

In a first series of experiments, newborn opossums (n=5) were pinned to the floor of a petri dish to allow FL movements and were stimulated by consecutive ejections of cold (4°C), neutral (22°C) and hot (35°C) solutions on the muzzle, and reactions to stimulations were observed under a microscope. In some cases, the specimens did not move their FL at all, which was marked as no-

response, while motor responses comprise uncoordinated and rhythmic movements of the FL (see M&M). All cold stimulations induced a generalized contraction of the axial musculature, as evidenced by rib and pectoral girdle bones movements, followed by extension of one or the two FL ($100.0 \pm 0.0\%$) whereas similar responses were induced $6.0 \pm 2.5\%$ and $14.0 \pm 7.5\%$ of the trials for neutral and hot stimulations, respectively (Fig. 3A, Supp. Table 1A). These differences are statistically significant ($p < 0.0001$, Friedman ANOVA; Table 3A), suggesting that newborn opossums are more sensitive to cold than to the other temperatures tested. The same specimens were then subjected to a bilateral transection of the trigeminal nerves and stimulated with ejections of the cold solution. The response rate was decreased to $62.0 \pm 21.5\%$. The same specimens were then transected caudally to the obex, at the spinoencephalic junction, which lead to response rate of $30.0 \pm 18.4\%$ for cold stimulation. Those results suggest that cold perception is partly mediated by cephalic sensory systems, such as the trigeminal nerve, but that it is not strictly restricted to the head.

We tested ejection of cold liquid towards the FL, the hindlimbs or the tail, before and after transections, and observed that such stimulations induced FL movements nearly all the time. We did not quantify these trials, but as cold ejections on these body parts were very potent to induce motor responses, it was used routinely to verify the responsiveness of the preparations, especially after nervous tissue sections or skin removal (see below).

Since stimulation temperatures around 35°C did not readily induced FL movements, we performed another series of experiments on 9 different specimens with cold, neutral and hot temperatures, with the latter being of 45°C (Fig. 3B; Supp. Table 1B). As expected, cold induced responses in $100.0 \pm 0.0\%$ of the trials whereas neutral and hot stimulations induced FL movements in $24.4 \pm 5.6\%$ and $37.8 \pm 11.0\%$, respectively, results which are highly statistically

significant ($p < 0.0001$, Friedman ANOVA; Table 3B). After another series of cold stimulations, which still elicited responses in $100.0 \pm 0.0\%$ of the trials, a complete transection at the obex decreased the response rate of cold stimulations to $80.0 \pm 8.8\%$; a rate corresponding to 2.7x the rate recorded in the previous series of experiments for cold stimulation after section at the obex. For neutral and hot temperatures stimulations, response rates obtained for stimulations at 22 and 45°C were respectively 4.1 and 2.7x those recorded in the previous series of experiments for stimulations at 25 and at 35°C. The generalized increase of response rate recorded in this series of experiments may reflect a higher reactivity to stimulation in these specimens, by comparison to those used in the previous experiments, rather than an effect of the different temperatures used for neutral and hot stimulations.

In a third set of experiments 12 specimens were first stimulated with cold, neutral, and hot (45°C) solution, and then the skin covering the head was removed before the specimens were stimulated again (Fig. 3C; Supp. Table 1C). Before skin removal, cold, neutral and hot stimulations induced responses in $97.5 \pm 1.8\%$, $21.7 \pm 6.9\%$ and $24.9 \pm 6.8\%$ of trials, respectively, which, after skin removal decreased to $89.2 \pm 6.1\%$, $4.2 \pm 3.4\%$ and 10 ± 5.2 . Only the decrease for the neutral temperature stimulation is statistically significant ($p < 0.01$; Wilcoxon t-test; Table 3C). Following a complete transection at the obex in the skin-free specimens, cold temperature stimulations induced FL movements in $23.3 \pm 10.3\%$ of trials, a highly significant decrease compared to the responses recorded before skin removal ($p = 0.001$; Wilcoxon t-test; Table 3C). Skin removal having barely decreased the FL responses to cold, it is possible that the receptors activated by cold are located in the remaining tissues of the dermis, the trigeminal ganglia or the neuraxis. So, in 4 specimens, we tested if puff ejections (10 per specimen) of cold liquid directed inside the skull – towards the brainstem and trigeminal ganglia (5G) – induced motor responses and it did in only

5% of the trials (2/40 stimulations, all in the same specimen). These results suggest that cold receptors are not located in the brainstem and 5G (Supp. Table 1E).

In order to determine if smaller variations of temperature can influence FL movements (Fig. 3D; Supp. Table 1D), 8 specimens were placed in a bath maintained at $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ and were subject to cold (21°C and 4°C), neutral (25°C) and hot (33°C) stimulations directed to the front of the snout. FL movements was induced in $92.5 \pm 4.1\%$ of the trials for stimulations at 21°C , in $11.3 \pm 5.2\%$ of the trials for neutral stimulations, in $5.0 \pm 1.9\%$ of the trials for stimulations at 33°C and in $100.0 \pm 0.0\%$ of trials for stimulations at 4°C . An ANOVA (Friedman ANOVA; Table 3D) showed that responses to 21°C stimulations are significantly different than those from neutral and hot stimulations, but not from 4°C stimulations, suggesting that the specimens are sensible to a relatively small drop in temperature. Moreover, as little as 10 μl puff ejections of cold liquid (4°C) induced FL movement in $100 \pm 0.0\%$ of the trials in the 4 specimens tested (Supp. Table 1F).

In all four series of experiments described previously, stimulations by liquid ejections sometimes induced rhythmic movements of the FL (Figure 4; Table 2). Such movements started first by an initial extension of both FL, followed by alternate extension of the FL. For the intact specimens tested (i.e., before transection or skin removal), cold stimulations (4°C) induced rhythmic responses in 61.8% of trials ($n=272/440$) while those tested at 21°C (bath at 25°C) performed similar responses in 25% of the trials ($n=20/80$). Neutral stimulations induced rhythmic responses in 1.7% of the trials ($n=6/350$), and stimulations at 33 and 45°C in 0% ($n=0/130$) and 0.5 % ($n=1/217$) of the trials, respectively. After transection of the trigeminal nerve, stimulations at 4°C induced locomotion in 36.0% of trials ($n=18/50$), and such responses were totally abolished after transection at the obex (0.0%, $n=0/90$). The 12 specimens tested after skin removal performed locomotion in 15.8% of the trials ($n=19/120$) when stimulated at 4°C , and 0.0% and 0.8% of the

trials for neutral (n=0/120) and hot stimulations (45°C; n=1/120), respectively. Noteworthy, ejections of 10 µl of cold liquid elicited rhythmic activity in 20.0% of trials in intact animals.

Electromyography

To further investigate FL responses induced by temperature, we recorded the activity of either one or the two *triceps brachii* in additional *in vitro* preparations of newborn opossums. The triceps muscles extend the during FL movements such as locomotion. However, due to the very small size of FL muscles and their immaturity, we cannot exclude that the activity of nearby muscles was recorded. In order to compare the EMG amplitude of motor response of from different muscles and different preparations, the amplitude was normalized as a percentage of the maximal amplitude obtained for this muscle in each experiment (see M&M). All normalized values were thereafter averaged for all recorded FL and the resulting averages (\pm s.e.m.) are given below. Except when notified, responses amplitude that were pooled for analysis include all data, even the absence of response (amplitude of 0%).

In a first series of EMG recordings, 8 specimens were stimulated 10 times with consecutive ejections of cold (4°C) and neutral (22°C) solution separated by intervals of 40 s (Figure 5; Supp. Table 2A). The average EMG response amplitude for cold and neutral temperature stimulations was 60.1 ± 2.5 % and 10.8 ± 1.6 %, respectively, which proved statistically different ($p < 0.0001$, Kolmogorov-Smirnov; Table 3E). Then, the specimens were removed from the recording platform, keeping the electrodes in place, and were put under a dissecting microscope to perform a complete and bilateral transection of the trigeminal nerve, before being returned to the recording platform. Response amplitudes following cold stimulations decreased to 23.7 ± 3.0 %, and those to

neutral stimulations were virtually abolished ($0.3 \pm 0.2\%$). Following a complete transection of the neuraxis, at the caudal level of the obex, stimulation with a cold solution led to a further decrease of EMG amplitude to $6.1 \pm 1.5\%$, which is statistically significant from the responses obtained before spinalization ($p < 0.0001$, Kruskal-Wallis ANOVA; Table 3E).

A second series of recordings was performed on 6 different specimens in order to characterize the responses to hot ($45\text{ }^{\circ}\text{C}$) temperatures (Fig. 5B; Supp. Table 2B). Specimens were first stimulated with cold solution and 40s later by neutral solution, then they were stimulated with hot solution and 40s later by neutral solution. Both series of paired stimulations were repeated ten times. Responses to neutral stimulations that followed cold and hot stimulations were pooled together during analysis. On average, triceps EMG amplitudes were $49.5 \pm 3.2\%$, $4.4 \pm 1.3\%$ and $13.4 \pm 4.2\%$, respectively for cold, neutral and hot stimulations. After a bilateral and complete transection of the trigeminal nerve, specimens were again stimulated with ejection of neutral and hot solutions, and the responses were almost abolished ($0.4 \pm 0.3\%$ and $1.8 \pm 0.8\%$, respectively). A Kruskal-Wallis ANOVA showed a strong statistical difference between response amplitudes to cold and all other temperatures ($p < 0.0001$) and a weaker difference ($p < 0.01$) between responses to hot stimulations before section and responses to neutral stimulations after section (Table 3F).

The amplitude of $13.4 \pm 4.2\%$ for responses to hot stimulations recorded before sectioning in the previous 6 specimens resulted in part from their lower occurrence than that of responses to cold stimulations. Indeed, when the responses to cold or hot stimulations with an amplitude = 0 were discarded from the analysis, the respective average amplitudes for cold, neutral and hot stimulations (before any trigeminal or spinal section) were then of $54.0 \pm 3.4\%$, $25.0 \pm 4.2\%$ and $41.4 \pm 11.2\%$, respectively (Fig. 6C; Supp. Table 2C). This difference is statistically highly

significant for responses to neutral and hot stimulations ($p < 0.0001$, Kolmogorov-Smirnov t-test, Table 3I).

For all EMG experiments, the ratio of responses for cold, neutral and hot temperatures was respectively $96.7 \pm 1.9\%$ ($n = 21$ FL), $23.4 \pm 5.3\%$ ($n=30$ FL) and $33.0 \pm 9.5\%$ ($n=9$ FL) (Fig. 6A; Supp. Table 4). After trigeminal nerve transection, response rate of cold stimulations was $62.0 \pm 13.0\%$ and those of neutral and hot were $4.1 \pm 1.7\%$ and $11.4 \pm 3.4\%$, respectively. Finally, after transection at the obex, the rate of response to cold temperature diminished further to $34.5 \pm 9.1\%$. See Table 3G for statistical analysis of all these data ($p < 0.0001$; Kruskal-Wallis ANOVA).

The latency of responses recorded before section were also measured for cold, neutral and hot stimulations on all 14 preparations used for EMG experiments (Fig. 6B, Supp. Table 3A). Stimulations with cold induced the fastest responses, with an average latency of 768 ± 27 ms ($n=213$ stimulations), while responses to hot stimulations were the slowest, and the responses to neutral temperature stimulations had an average latency of $2303 \text{ ms} \pm 185 \text{ ms}$ ($n= 29$ stimulations) and 1073 ± 68 ms ($n=68$ stimulations), respectively. Each one of these latencies differs significantly from the other two ($p < 0.0001$, Kruskal-Wallis ANOVA; Table 3H).

In 9 preparations used in the previous experiments, the EMG were recorded in both triceps to allow interlimb comparisons, and only to cold stimulations since response was greater than to other temperatures in the previous experiments. On average, the response amplitudes for the right and the left FL were $49.0 \pm 3.4\%$ and $58.1 \pm 3.0\%$, respectively ($n= 86$ stimulations) (Supp. Table 2D), and were not statistically significant ($p=0.1019$, Kolmogorov-Smirnov t-test; Table 3J). The average latencies were 879 ± 53 ms and 750 ± 37 ms for the right and for left FL, respectively ($n= 78$ stimulations) (Supp. Table 3B), values that are not statistically different ($p=0.3144$,

Kolmogorov-Smirnov t-test, Table 3K). In response to cold stimulations, 2 specimens sometimes showed a synchronous burst of triceps activity followed by a series of bursts alternating between the right and left muscle (Figure 2E). These rare rhythmic movements were observed 70% of the time in one of the specimens, and 20% of the time in the other. However, in contrast to the preparations in which the FL were free to move and rhythmic movements were often observed, the FL of the preparations used for the EMG recordings were pinned to the substrate, which may have prevented the expression of alternation in the triceps responses in most these specimens.

Immunohistochemistry and RT-PCR

As TRPM8 underlies the sensation of cold in most mammal species studied, we used immunochemistry to assess if this receptor is expressed in newborn opossums. At P0/P1, P5, P7 and P9, TRPM8 labeling was detected at the apex of some epithelial cells dispersed in the aerial pathways (Fig. 7F) but was not observed in the CNS, sensory ganglia, or nerves (Fig. 7A-B). TRPM8 labeling was seen at P13-14 in the trigeminal ganglia and facial skin in 2 of the 5 specimens (Fig. 7C). Noteworthy, in most of these specimens from P1 to P14, patches of diffuse labelling were observed in the epidermis (Fig. 7E). These results suggest that TRPM8 receptors are not expressed in nervous tissues before the end of the second postnatal week.

To confirm these findings, we tried to assess TRPM8 mRNA's presence in P0-12 opossums head tissues by RT-PCR (Fig. 8). GAPDH amplification from all samples suggests that total RNA was successfully extracted, but no amplification of TRPM8 mRNA was obtained at P0 and P12. Adult testis mRNA was used as a positive control for cDNA TRPM8 primers. TRPM8 cDNA was successfully amplified from this sample. Together, immunohistochemical and RT-PCR

findings support the idea that TRPM8 are not the receptors involved in the responses to cold in newborn opossums, but they are nonetheless expressed later in life.

Discussion

To test if neonatal opossums are sensitive to external changes in temperature, we observed FL movements and recorded triceps EMG responses to thermal stimulation of the snout in *in vitro* preparations where most peripheral and central networks components are intact. We hypothesised that the newborn opossum is attracted the mother's warm belly, which could sustain or orient FL movements, but we found out that cold temperatures proved far more potent to induce FL responses than hot temperatures. Indeed, in all series of experiments, cold stimulations induced systematic strong FL responses, whereas those elicited by neutral and hot stimulations were of a lesser intensity and occurred, on average, in less than one-third of stimulations. Removal of the facial skin decreased responses to cold and nearly abolished those to neutral and hot temperatures, indicating that these responses depended, at least partly, on cutaneous receptors. Bilateral transection of the trigeminal nerve or complete transection at the caudal level of the obex nearly abolished responses to neutral and hot stimulations and decreased the responses to cold stimulations, showing that cold perception is not restricted to the head in the newborn opossum. Ejections of cold liquid directly on the neuraxis and trigeminal ganglia did not induce motor responses, supporting the idea that temperature is indeed perceived peripherally by sensory fibers

Trigeminal afferents relay thermal and mechanical sensations

As mentioned in the introduction, the trigeminal system is responsible for mechanosensory, nociceptive and thermosensitive inputs from the face. It was shown in previous studies that trigeminal stimulation can exert a strong influence on motor behaviors of newborn opossums and that facial mechanosensation is functional at birth (Adadja et al., 2013; Desmarais et al., 2016). To determine if thermosensation is also mediated by the trigeminal system in the newborn opossum, complete transections of the 5N were performed. Such transections decreased responses to cold and hot stimulations, but did not abolish them, probably because the liquid diffused to portions of the cephalic skin innervated by other cranial nerves (e.g., vagus). Subsequent transection of the caudal part of the obex decreased responses to cold even more, but without abolishing them. This may be explained by diffusion of the cold liquid to the skin of the neck and FL. However, responses to neutral stimulations were nearly abolished after transection of the 5N or skin removal. Experiments done on similar *in vitro* preparations of newborn opossums showed that proportionally strong facial pressures induce triceps muscle contractions, and that they were decreased but not totally abolished (5% of the maximal amplitude) after skin removal (Desmarais et al., 2016). Thus the motor responses to thermal stimulations in intact animals may result entirely, or for a large part, from mechanical pressures induced on the face by liquid ejections.

Considering the responses to liquid at bath temperature as provoked by mechanosensory mechanisms, stimulation with colder liquid induce an additional effect. Indeed, when compared to responses induced by neutral stimulations in intact animals, responses following cold stimulations occurred on average 4-5 times more often, with an amplitude 4-5 times higher and with a latency 300ms shorter. Thus, cold thermosensation exerts an excitatory influence on motor circuits in addition to that of mechanosensation. The effect of hot temperature is less clear

as, when all reactions to stimulation are considered (i.e., comprising absence of response), hot stimulations show response occurrence and amplitude that are not significantly different from those following neutral stimulations. However, when only responses with a positive amplitude are compared, two facts suggest that hot stimulations and neutral stimulations act on different networks. First, the mean latency of responses to hot stimulation is about twice (2.3s vs. 1.1s, respectively for hot and neutral) and the variability in the latencies is about thrice that of responses to neutral stimulation (s.e.m. of 184.8 and 68.1, respectively for hot and neutral). Second, the amplitude of responses to hot stimulations are on average 1.7 time that of responses to neutral stimulation (41.4% of maximal response vs. 25%, respectively for hot and neutral) and, as in the case of latencies, the variability is larger (s.e.m. of 11.2 and 4.2, respectively for hot and neutral). An explanation to the larger variability of responses to hot stimulations could be that hot thermosensors activate inhibitory circuits in addition to excitatory ones. A mixture of inhibitory and excitatory inputs would result in a larger variability in the occurrence, strength and latency of responses to hot stimulation.

An evidence supporting the idea that innocuous warm temperature has inhibitory or depressing effects on motor behaviors in young marsupials, and that it could be linked to maturation, is given by observations on Tammar wallabies (*Macropus eugenii*) aged from P15 and over (Ho, 1997). This author recorded FL movements in animals removed from the mother's pouch and laid supine on a holder to induce locomotion. When the holder was put in an incubator and the ambient temperature increased from 25°C to 37°C, the frequency of the ongoing locomotor rhythm diminished in less than a minute. After 5 minutes, the cycle slowed to about 70% of the initial frequency at younger ages (P15-39) and even halted at older ages (P40 and over). At all ages, a return to an ambient temperature of 25°C stimulated locomotor activity in

the FL. However, it has been reported that, in *in vitro* preparations of isolated brainstem-spinal-cord of P0-3 opossums (*M. domestica*), both the amplitude of spinal reflexes evoked electrically and the frequency of spontaneous activity are greater at ~23°C than at ~28°C (Nicholls et al., 1990). As peripheral receptors were removed during dissection in these preparations, it suggests that some mechanisms intrinsic to the SNC may also depress motor activity in response to warmer temperatures.

After complete skin removal from the head, FL responses to all temperatures were still observed, even if those to neutral and hot stimulations were abolished in most specimens. These persistent responses to stimulations after skin removal could be due to exposure of thermosensory and mechanosensory free nerve endings in the remaining dermis that are present in the tissues of the snout. Furthermore, cells in the nasal and oral mucosae of adult rodents express hot and cold sensitive receptors TRPV1 and TRPM8 (Ishida et al., 2002; Kido et al., 2003; Abe et al., 2005; Liu et al., 2015) and our immunohistochemistry experiments have shown that a small number of cells sparsely distributed in the aerial epithelia showed TRPM8 labeling as early as P1. It is not known if these cells are innervated by sensory afferents or if the removal of the skin may have increased their exposure to thermal stimuli, but their scarcity does not support an implication in sensorimotor behaviors in newborn opossum.

Our attempts to stimulate only one side of the head were not successful due to the diffusion of the liquid, so we directed stimulations towards the snout, although for the same reason we could not be sure that the liquid diffused equally on both sides of the head. The resulting triceps EMG responses appeared bilateral and showed no significant difference in amplitude nor latencies between the left and right FL. However, it seems that trigeminal inputs are relayed bilaterally to the spinal cord at least at immature stages. Indeed, in the opossum and the tadpole, mechanical

stimulation of one side of the face led to bilateral FL movements or swimming behaviour (Boothby et Roberts 1993; Buhl et al., 2012; Desmarais et al., 2016). Moreover, in the neonatal rat, experiments in *in vitro* preparations showed that electrical stimulation of the 5G induced bilateral responses in lumbar motoneurons (Vinay et al., 1995).

Receptors involved in FL responses

Mechanoreceptors activated by liquid ejection are most likely Merkel cells, as they are particularly abundant in the perioral area of newborn marsupials and that are thought to be present in newborn opossums as well (Jones & Munger, 1985; Gemmell et al., 1988; Waite et al., 1994; Desmarais et al., 2016). Merkel cells are epidermal cells innervated by free endings physiologically characterized as slowly adapting type 1 (SA1) (reviews in Lucarz & Brand, 2007; Zimmerman et al., 2014). In mammals at mature stages, Merkel cells and SA1 fibers can be sensitive to cold and express TRPM8, the cold and menthol receptor (McKemy et al. 2002; Peier et al., 2002a; Cahusac & Noyce, 2007; Bouvier et al., 2018), but it is unlikely to be the case in the newborn opossums as our immunohistochemistry experiments show that TRPM8 receptors are not expressed in sensory neurons before P13. These results were confirmed by RT-PCR experiments, showing no expression of TRPM8 before P12. However, some TRPM8 labeling was observed as a diffuse background in patches of the epidermis as early as P1, which was undetected in RT-PCR. This could be explained by the presence of the truncated epidermal TRPM8 (eTRPM8), an isoform of TRPM8 that have been shown to be expressed by in the endoplasmic reticulum of keratinocytes and to play a cold-dependent role in the proliferation and differentiation of these cells (Denda et al., 2010; Bideaux et al., 2015). The presence of eTRPM8 in the epidermis of the newborn opossum

has to be confirmed but, even if this isoform is really expressed, it does not play an important role in cold sensation as skin removal in our experiments did not reduced significantly the motor responses to cold stimulations.

A good candidate for heat perception in the newborn opossum is the heat and capsaicin receptor TRPV1 (Caterina et al., 1997), which is expressed in mouse sensory ganglia starting around E12.5 (Tamura et al., 2005; Funakoshi et al., 2006; Hjerling-Leffler et al., 2007). Synapses between TRPV1 expressing neurons located in DRG and spinal neurons are thought to be already fully functional at birth in rats (Baccei et al., 2003). Therefore, it is possible that it is similarly expressed and functional at birth in the opossum and account for the responses observed to hot temperatures. However, no TRPV1 homologue has yet been annotated in marsupial genomes, making further investigation on the expression of this receptor difficult in the opossum.

Development of Thermosensation

Based on physiological recordings and gene expression experiments on dissociated spinal DRG cells, Hjerling-Leffler et al. (2007) proposed a model of sequential emergence of some thermoreceptors (TRPV1, TRPM8, and TRPA1) during mouse development. According to this model, capsaicine-sensitive heat receptors TRPV1 are expressed first, at E11.5-12.5 in the mouse, followed by menthol-sensitive cold receptors TRPM8, at E16.5 (Hjerling-Leffler et al., 2007). However, these authors recorded cellular responses to cold in DRG neurons as early as E11.5, before the recording of menthol-induced TRPM8 responses. This observation may explain why the newborn opossum shows cold thermosensation even in the absence of TRPM8 receptors in the nervous tissues. As said before, opossums are comparable to E11.5-13.5 mouse embryo at birth.

Thus, even if TRPM8 is considered the main cold receptor in mature mammals (Bautista et al., 2007; Dhaka et al., 2007; Knowlton et al., 2013; Pogorzala et al., 2013; Yarmolinsky et al., 2016), it is not the first molecular receptors that underlie cold thermosensation during development. Furthermore, it has been shown in adult rats and mice, as well as in the chicken, that a sub-population of cold responding sensory neurons are insensitive to menthol (Thut et al., 2003; Babes et al., 2004; 2006; Munns et al. 2007; Yamamoto et al., 2016). The molecular basis of most of these TRPM8-independent mechanisms of cold detection are still unknown, but they could develop earlier than TRPM8 and be responsible for cold detection in perinatal opossums as in other mammals.

Therefore, it seems that another type of receptor responds to cold in neonatal opossums and other mammals in early development. A candidate could be TRPA1 a thermoTRP activated by cold temperatures in the noxious range ($<17^{\circ}\text{C}$) (Story et al., 2003), but its ability to transduce cold perception *in vivo* has been questioned (Bandell et al., 2004; Bautista et al., 2006; Pogorzala et al., 2013). Another possibility is TREK-1, a two-pore domain K^{+} channel that closes when temperature decreases, and it is abundantly expressed in nervous and non-nervous tissues of mouse embryos (Maingret et al., 2000; Aller & Wisden, 2008). Alternately, temperatures below 37°C amplify sodium currents mediated by the ENaC channel whereas its pharmacological blockade diminishes responses to cold in DRG neurons (Askwith et al., 2001; Thut et al., 2003). Also, voltage-gated sodium channels like Nav1.6 or Nav1.8 could play a role in early thermosensation in mammals as they were shown to be involved cold-induced pain (Zimmermann et al., 2007; Deuis et al., 2013).

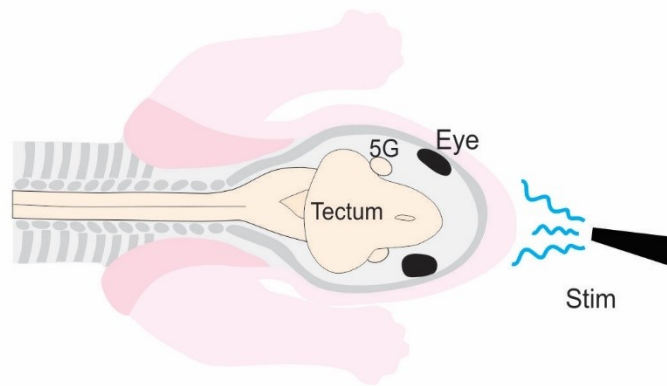
Thermosensation at birth

Cold stimulations induced motor activity in a greater proportion and with a greater amplitude than hot stimulations did, which could be interpreted as a cold avoidance behavior. Cold avoidance was previously noticed in newborn marsupials by Langworthy (1928), upon his research on the American opossum (*Didelphis virginiana*), where he observed that newborns removed from the mother's pouch seemed to crawl towards a warm source and away from cold. In our experiments, this avoiding behavior could be partly due to the noxious temperature used for cold stimulations (4°C), however we have shown that innocuous cold stimulations could also induce strong and systemic FL movements while noxious heat (45-48°C) failed to do so. Whatsoever, responses to noxious heat were sometimes of a great amplitude, then perhaps the use of temperatures superior to 50°C could induce avoiding behaviors as well, as it has been observed in neonatal rats (P1-21), that a 60°C heating of the hindlimb induced paw withdrawal reflex (Fitzgerald & Gibson, 1984).

Most of the experiments were performed while bath temperature was maintained at 22°C and cold stimulations were performed at 4°C, which falls in the noxious temperature range. However, in its natural habitat in Brazil, Bolivia, Paraguay and North Argentina, *Monodelphis domestica* is found in rainforests and bushy thorn scrubs (Myers & Wetzel, 1979; Macrini, 2004; VandeBerg & Williams-Blangero, 2010) so it would be unlikely for this species to encounter frequently such low temperatures in the wild. Therefore, we tested if smaller variations of temperature would be enough to trigger FL movements. Indeed, when bath temperature is maintained at 25°C, stimulations with liquid at 21°C were enough to induce FL movements, comprising rhythmic activity, at a similar rate than stimulations with colder liquid. It is then possible that the contrast in temperature at birth, between the uterus and the ambient temperature, may induce or sustain the locomotor behavior of the newborns until they find a nipple. However,

as the female often rests in a nest when giving birth, it is possible that the ambient temperature is close to her bodily temperature. Nevertheless, it was shown in another marsupial, the northern quoll, that a temperature gradient, ranging from 29°C at the urogenital sinus to 31°C in the pouch, was present on the female's belly during gestation only (Nelson & Gemmell, 2005). The body temperature of adult *M. domestica* is 32.6°C (Dawson & Olson, 1988), and if a similar gradient was present on the belly of the pregnant female opossum perhaps temperature may trigger and sustain locomotor activity until the newborn finds a teat where it attaches.

A



B

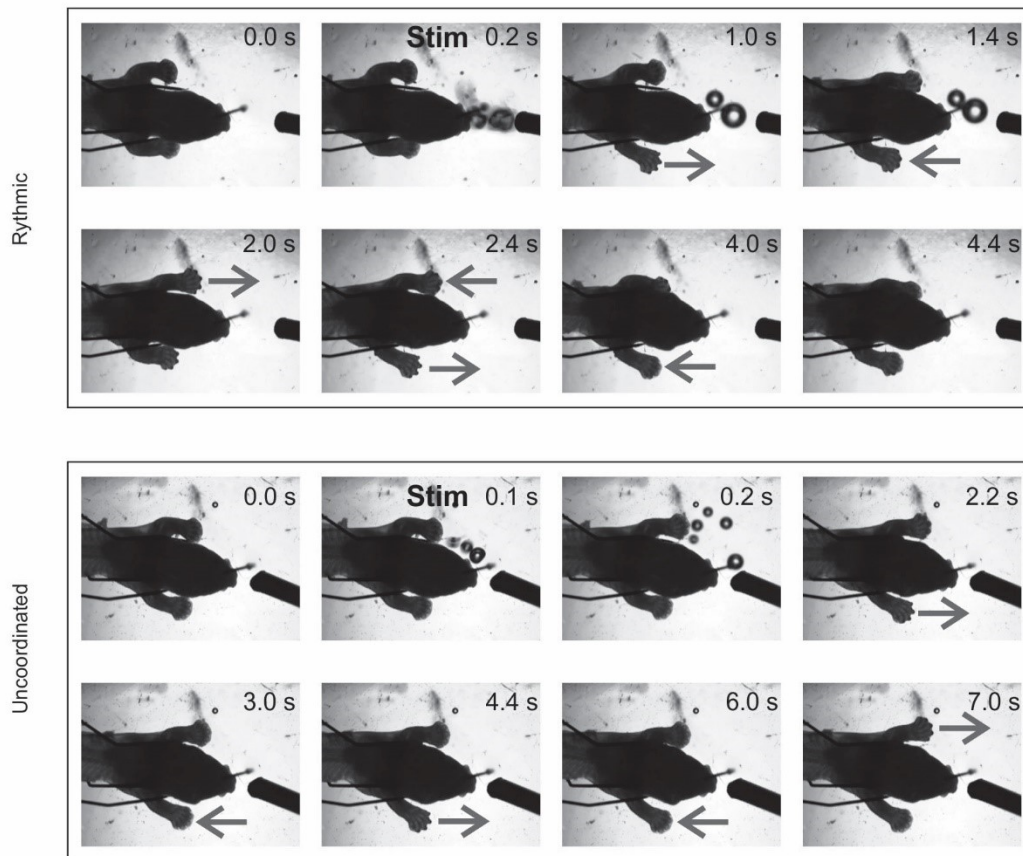


Figure 1. Observation of FL movements experiments A) Schematic representation of the *in vitro* preparation. The specimen has skin over all its face, neck and FL, and the FL are free to move. B) Serial photographs taken from video of either rhythmic (left-right alternation; upper rows) or uncoordinated (lower rows) responses. Arrows indicate the direction of paw movements.

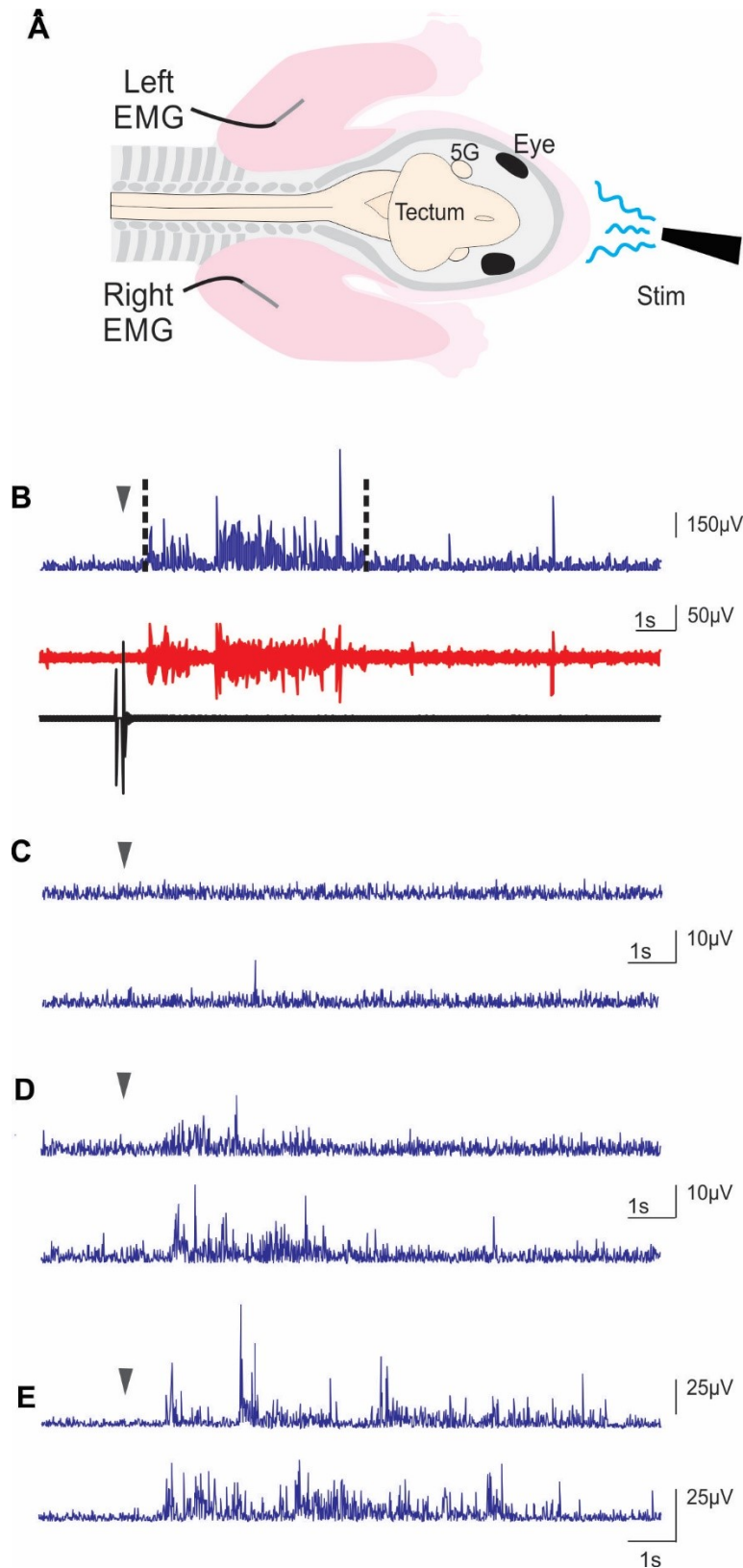


Figure 2. EMG experiments. A) Schematic representation of the preparations used in EMG recordings. Skin was removed on the neck and FL, and EMG electrodes were implanted in triceps muscles. Stim, stimulation. B) Muscle activity following a stimulation. Bottom black trace, stimulation artifact produced by the pedal; red trace, raw recording from one EMG; blue trace, same trace as in red, but rectified and with reduced sampling rate. The dashed lines delimitate the duration of the response used for analysis. C-E) Examples of reactions to stimulation: no-response (C), uncoordinated response (D) and rhythmic response (E). In B-E, the arrowheads indicate the beginning of the stimulation.

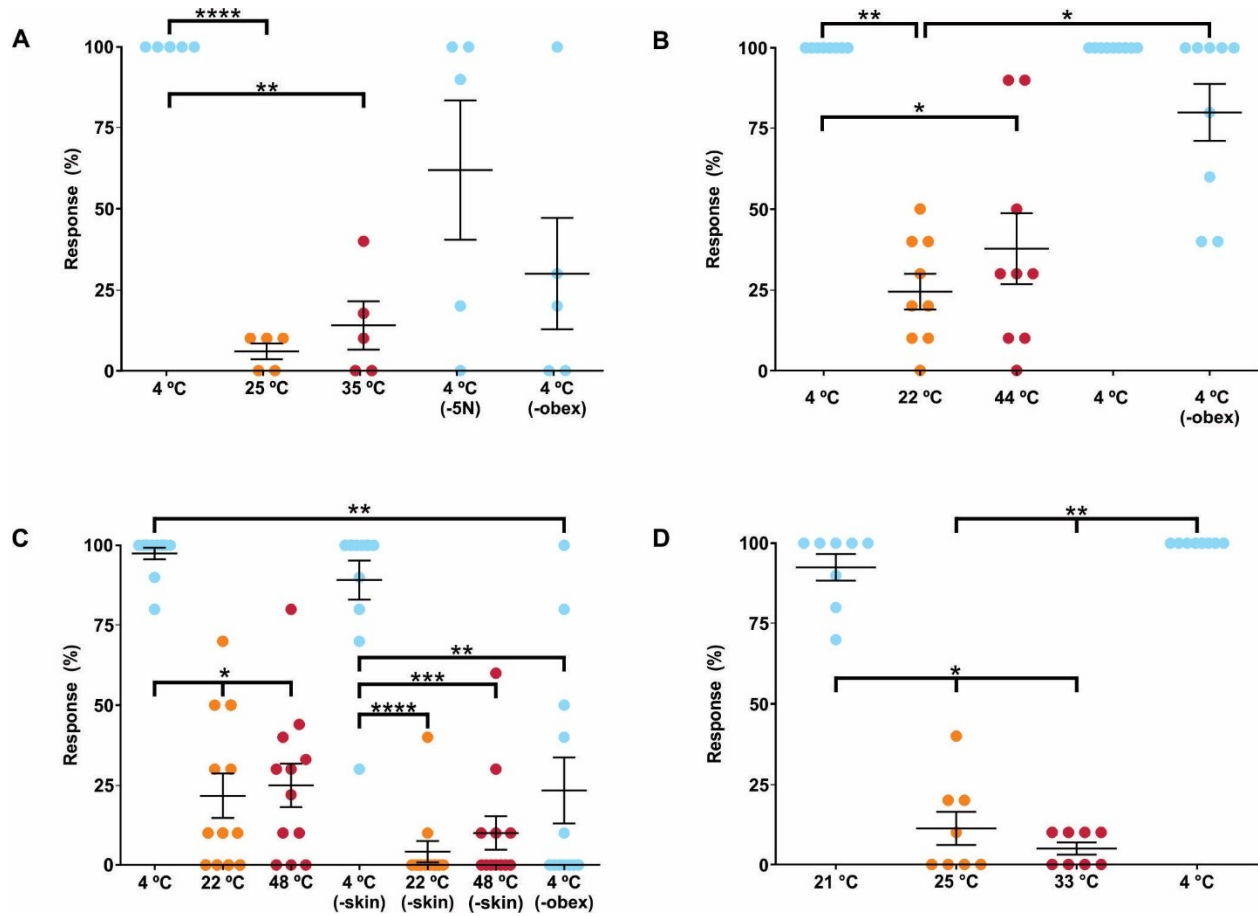


Figure 3. Percentage of FL responses after cold (blue: 4°C or 21°C), neutral (orange: 22-25°C) or hot (red: 33-48°C) stimulations. Each panel represents different series of experiments during which the specimens were consecutively stimulated. In a given panel, each dot represents one specimen. In all panels, whisker plots stand for mean \pm s.e.m. and thick horizontal lines indicate statistical differences between columns.

Abbreviations: -5N, transection of the trigeminal nerve; -obex, transection of the neuraxis, caudally to the obex; -skin, removal of facial skin.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

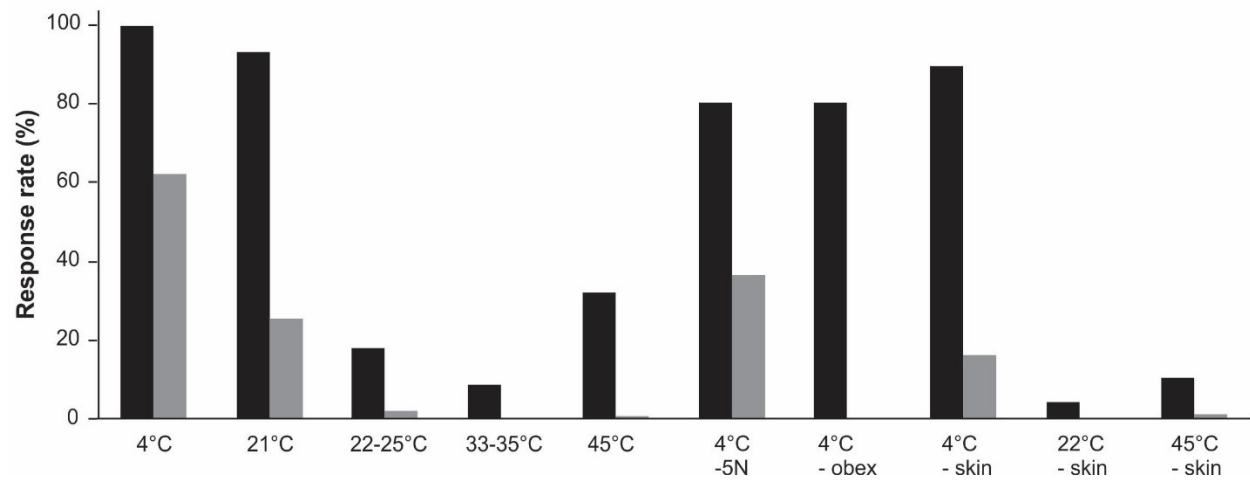


Figure 4. Comparison of rhythmic and uncoordinated responses after thermal stimulations in FL movements observation experiments.

Abbreviations: -5N, transection of the trigeminal nerve; -obex, transection of the neuraxis, caudally to the obex; -skin, removal of facial skin.

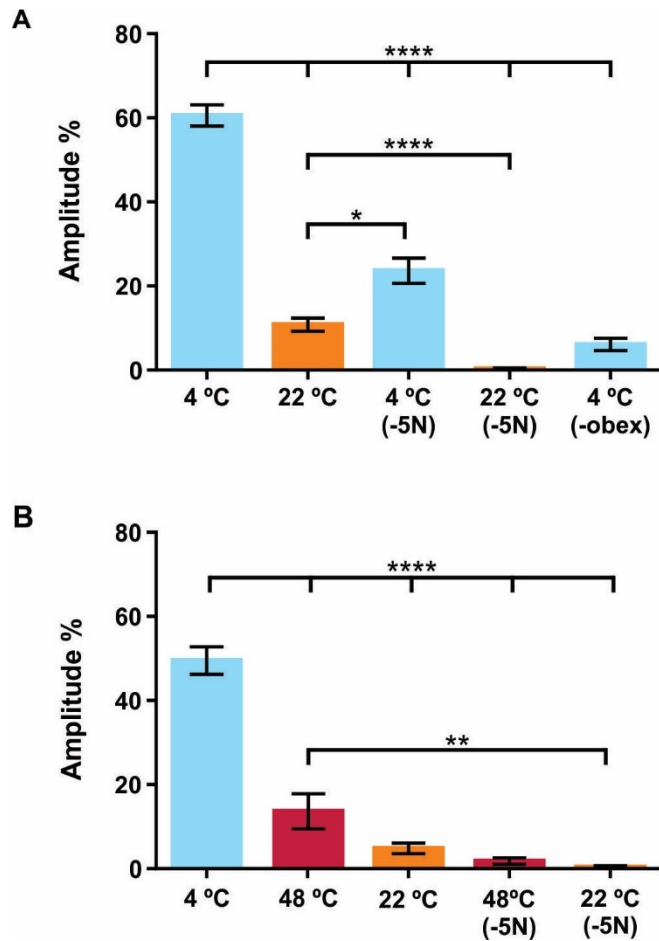


Figure 5. EMG recordings of the triceps muscles following thermal stimulations. A) Normalized response amplitude to cold (blue: 4°C) or neutral (orange: 22°C) temperature before and after trigeminal nerve transection and, then, after spinal transection. B) Normalized response amplitude to cold, neutral, and hot (red: 45°C) temperatures before and after trigeminal nerve transection. In all panels, whisker plots stand for mean \pm s.e.m. and thick horizontal lines indicate statistical differences between columns.

Abbreviations: -5N, transection of the trigeminal nerve; -obex, transection of the neuraxis, caudally to the obex.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

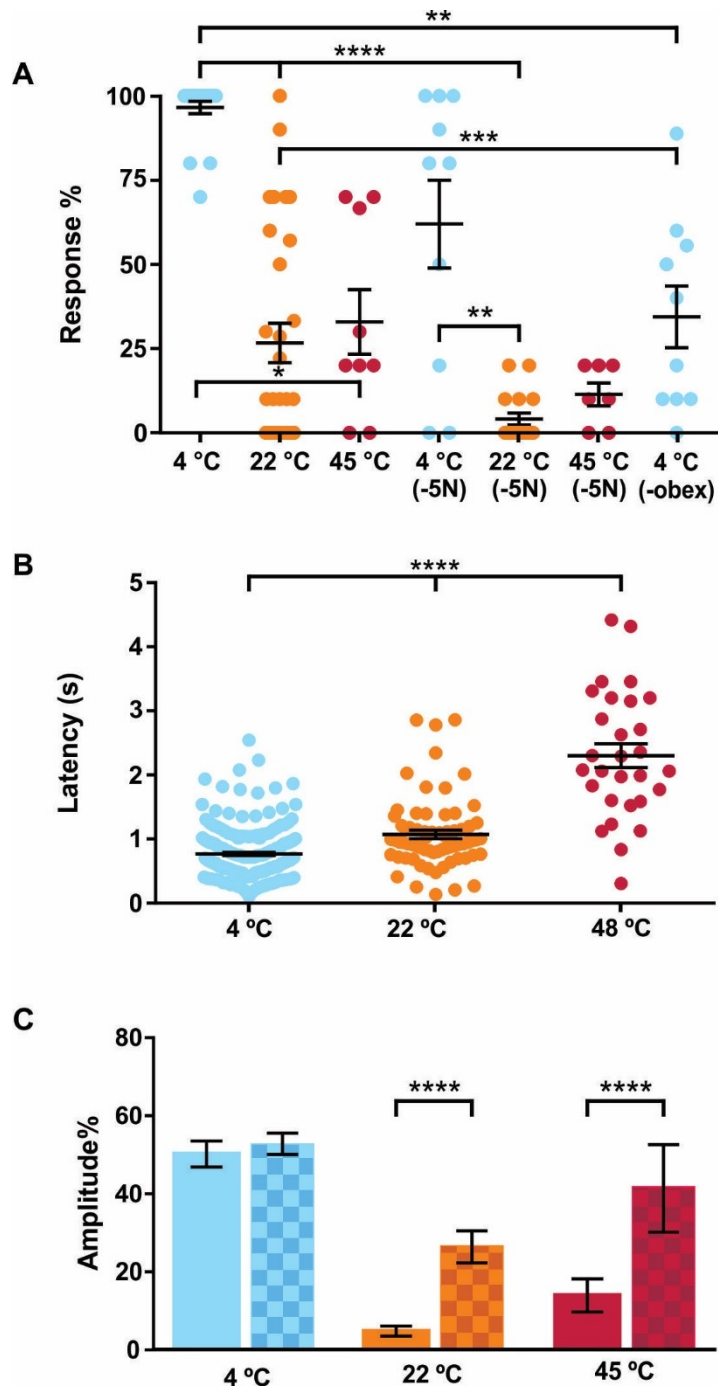


Figure 6. Compilation of EMG responses for all specimens. A) Occurrence of triceps responses after cold (blue: 4°C), neutral (orange: 22°C) and hot (red: 45°C) temperatures before and after trigeminal nerve or spinal transection. Each dot represents one FL. B) Comparison between latency of response after cold, neutral, and hot stimulations; each dot represents one response. C) Normalized EMG amplitude of responses to cold, neutral, and hot temperature before and after responses are pooled with amplitudes > 0. In all panels, whisker plots stand for mean \pm s.e.m. and thick horizontal lines indicate statistical differences between columns.

Abbreviations: -5N, transection of the trigeminal nerve; -obex, transection of the neuraxis, caudally to the obex.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

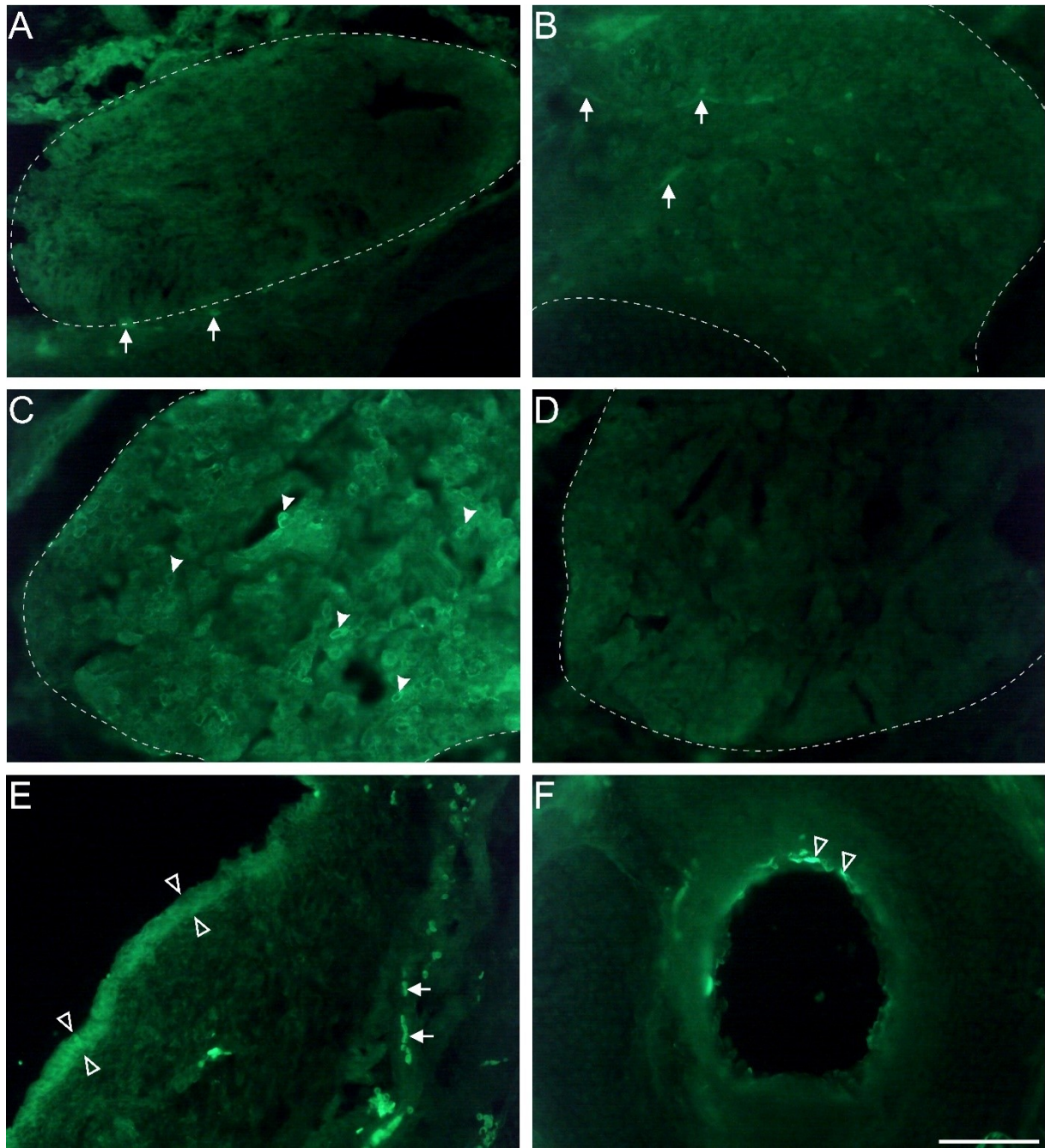


Figure 7. TRPM8 immunoreactivity in transverse sections of cephalic tissues of newborn opossums. A-D) Trigeminal ganglia (delineated by the dashed lines) at P1 (A), P9 (B), and P13 (C, D) processed with (A-C) or without (D) the primary antibody against TRPM8. Labeled cell bodies are present only at P13 (arrowheads in C). E) Snout from a P9 opossum showing diffuse TRPM8 labeling in the epidermis (between empty arrowheads). F) Labeled apical membrane of some epithelial cells (empty arrowheads) in the trachea of a P9 opossum. Solid arrows point the blood vessels. Scalebar in F = 100 μ m for A-F.

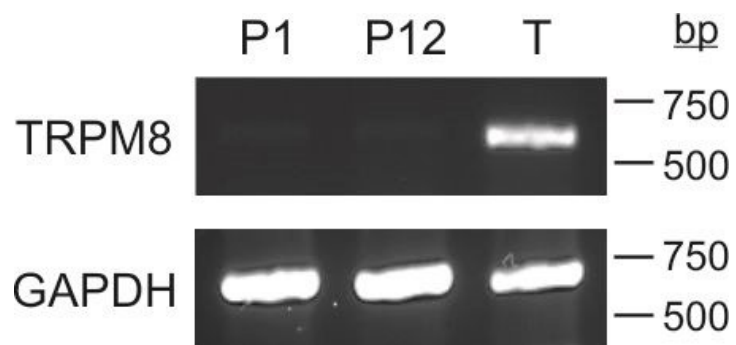


Figure. 8. RT-PCR gels illustrating the expression of GAPDH (A) and TRPM8 (B) in the head of newborn opossums (P1, P12) and in adult testis (T).

Tables

Table 1. *Monodelphis domestica* specific primers used in RT-PCR experiments.

Gene	Sequence (5'-3')
GAPDH	Forward: TAAATGGGGAGATGCTGGAG Reverse: GCCAGCATCGAAGGTAGAAG
TRPM8	Forward: GGTCATTTGGGAGCAGACGA Reverse: ATCCATGAGCAGCACGTAGG

Table 2. Percentage of uncoordinated and rhythmic FL movements in 34 *in vitro* preparations of newborn opossums.

Condition	n	Uncoordinated	%	Rhythmic	%
4 °C	440	437	99.3	272	61.8
21 °C	80	74	92.5	20	25.0
22-25 °C	350	62	17.7	6	1.7
33-35 °C	130	11	8.5	0	0.0
45 °C	217	69	31.8	1	0.5
4 °C -5N	50	40	80.0	18	36.0
4 °C- obex	90	72	80.0	0	0.0
4 1C - skin	120	107	89.2	19	15.8
22 °C - skin	120	5	4.2	0	0.0
45 °C - skin	120	12	10.0	1	0.8

Abbreviations : n, number of stimulations; -5N, trigeminal nerve transection; -obex, transection of the neuraxis, caudally to the obex; -skin, facial skin removal.

Table 3. Statistical tests performed for behavioral observations and EMG recordings.

Figure	Description	Data structure	Type of test	<i>p</i> value
A 3A	Comparison between stimulations at cold (4°C), neutral (25°C), hot (35°C), cold - 5N transection and cold -obex	Paired, non-parametric	Friedman ANOVA	0.0041
	Cold vs. neutral		Dunn's post-test	<0.0001
	Cold vs. hot		Dunn's post-test	<0.01
	Cold vs. -5N		Dunn's post-test	n.s.
	Cold vs. -obex		Dunn's post-test	n.s.
	Neutral vs. hot		Dunn's post-test	n.s.
	Neutral vs. cold -5N		Dunn's post-test	n.s.
	Neutral vs cold -obex		Dunn's post-test	n.s.
	Hot vs. -5N		Dunn's post-test	n.s.
	Hot vs. -obex		Dunn's post-test	n.s.
B 3B	Comparison between stimulations at cold (4°C), neutral (22°C), hot (45°C), and cold -obex	Paired, non-parametric	Friedman ANOVA	<0.0001
	Cold vs. neutral		Dunn's post-test	<0.01
	Cold vs. hot		Dunn's post-test	<0.05
	Cold vs. -obex		Dunn's post-test	n.s.
	Neutral vs. hot		Dunn's post-test	n.s.
	Neutral vs cold -obex		Dunn's post-test	<0.05
	Hot vs. -obex		Dunn's post-test	n.s.
C 3C	Comparison between stimulations at cold (4°C), neutral (22°C), hot (45°C), cold - skin, neutral -skin, hot -skin and cold - obex	Paired, non-parametric	Friedman ANOVA	<0.0001
	Cold vs. neutral		Dunn's post-test	<0.05
	Cold vs. hot		Dunn's post-test	<0.05
	Cold vs. cold - skin		Dunn's post-test	n.s.
	Cold vs. neutral -skin		Dunn's post-test	n.s.
	Cold vs. hot -skin		Dunn's post-test	n.s.
	Cold vs. cold-obex		Dunn's post-test	<0.01
	Neutral vs. hot		Dunn's post-test	n.s.
	Neutral vs. cold -skin		Dunn's post-test	n.s.
	Neutral vs. neutral -skin		Dunn's post-test	n.s.
	Neutral vs. hot – skin		Dunn's post-test	n.s.
	Neutral vs. cold-obex		Dunn's post-test	n.s.
	Hot vs. cold -skin		Dunn's post-test	n.s.
	Hot vs. neutral -skin		Dunn's post-test	n.s.
	Hot vs. hot -skin		Dunn's post-test	n.s.
	Hot vs. cold -obex		Dunn's post-test	n.s.
	Cold -skin vs. neutral -skin		Dunn's post-test	<0.0001
	Cold -skin vs. hot -skin		Dunn's post-test	<0.001
	Cold -skin vs. cold -obex		Dunn's post-test	<0.01
	Neutral -skin vs. hot -skin		Dunn's post-test	n.s.
	Neutral -skin vs. cold -obex		Dunn's post-test	n.s.
	Hot -skin vs. cold -obex		Dunn's post-test	n.s.
	Cold vs cold-skin		Wilcoxon t-test	0.25

		Cold vs. cold -obex		Wilcoxon t-test	0.001
		Hot vs hot -skin		Wilcoxon t-test	0.0898
		Neutral vs. neutral -skin		Wilcoxon t-test	0.0078
		Cold -skin vs cold-obex		Wilcoxon t-test	0.0015
D	3D	Comparison between stimulations at cold (21°C), neutral (25°C), hot (33°C) and cold (4°C)		Dunn's post-test	n.s.
		Cold (21°C) vs. neutral		Dunn's post-test	<0.05
		Cold (21°C) vs. hot		Dunn's post-test	<0.05
		Cold (21°C) vs cold (4°C)		Dunn's post-test	n.s.
		Neutral vs. hot		Dunn's post-test	n.s.
		Neutral vs. cold (4°C)		Dunn's post-test	<0.01
		Hot vs. cold (4°C)		Dunn's post-test	<0.01
E	5A	EMG amplitudes for cold (4°C), neutral (22°C), cold -5N, neutral -5N and cold -obex	Unpaired, non-parametric	Kruskall-Wallis ANOVA	<0.0001
		Cold vs. neutral		Dunn's post-test	<0.0001
		Cold vs. cold -5N		Dunn's post-test	<0.0001
		Cold vs neutral -5N		Dunn's post-test	<0.0001
		Cold vs. cold -obex		Dunn's post-test	<0.0001
		Neutral vs. cold -5N		Dunn's post-test	<0.05
		Neutral vs. neutral -5N		Dunn's post-test	<0.0001
		Neutral vs. cold -obex		Dunn's post-test	n.s.
		Cold -5N vs. neutral -5N		Dunn's post-test	n.s.
		Cold -5N vs. cold -obex		Dunn's post-test	n.s.
		Cold vs. neutral		Kolmogorov-Smirnov t-test	<0.0001
F	5B	EMG amplitudes for cold (4°C), neutral (22°C), hot (45°C) and hot -5N and neutral -5N	Unpaired, non-parametric	Kruskall-Wallis ANOVA	<0.0001
		Cold vs. neutral		Dunn's post-test	<0.0001
		Cold vs. hot		Dunn's post-test	<0.0001
		Cold vs. hot -5N		Dunn's post-test	<0.0001
		Cold vs. neutral -5N		Dunn's post-test	<0.0001
		Hot vs. neutral		Dunn's post-test	n.s.
		Hot vs. hot -5N		Dunn's post-test	n.s.
		Hot vs. neutral -5N		Dunn's post-test	<0.01
		Neutral vs. hot -5N		Dunn's post-test	n.s.
		Neutral vs. neutral -5N		Dunn's post-test	n.s.
G	6A	EMG response rate (%) for cold (4°C), neutral (22°C), hot (45°C), cold -5N, neutral -5N, hot -5N and cold -obex		Dunn's post-test	n.s.
		Cold vs. neutral		Dunn's post-test	<0.0001
		Cold vs. hot		Dunn's post-test	n.s.
		Cold vs. cold -5N		Dunn's post-test	n.s.
		Cold vs neutral -5N		Dunn's post-test	<0.0001
		Cold vs. hot -5N		Dunn's post-test	n.s.
		Cold vs. cold -obex		Dunn's post-test	<0.01
		Neutral vs. hot		Dunn's post-test	<0.05
		Neutral vs. cold -5N		Dunn's post-test	n.s.
		Neutral vs. neutral -5N		Dunn's post-test	n.s.

		Neutral vs. hot -5N		Dunn's post-test	n.s.
		Neutral vs. cold -obex		Dunn's post-test	<0.001
		Hot vs. cold -5N		Dunn's post-test	n.s.
		Hot vs. neutral -5N		Dunn's post-test	n.s.
		Hot vs. hot -5N		Dunn's post-test	n.s.
		Hot vs. cold -obex		Dunn's post-test	n.s.
		Cold -5N vs. neutral -5N		Dunn's post-test	<0.01
		Cold -5N vs hot -5N		Dunn's post-test	n.s.
		Cold -5N vs. cold -obex		Dunn's post-test	n.s.
		Neutral -5N vs. hot -5N		Dunn's post-test	n.s.
		Neutral -5N vs. cold -obex		Dunn's post-test	n.s.
		Hot -5N vs. cold -obex		Dunn's post-test	n.s.
H	6B	Comparisons of latencies for cold (4°C), neutral (22°C) and hot (45°C)	Unpaired, non-parametric	Kruskall-Wallis ANOVA with Dunn's post-test's post tests	<0.0001
		Cold vs. neutral		Dunn's post-test	<0.0001
		Cold vs. hot		Dunn's post-test	<0.0001
		Neutral vs. hot		Dunn's post-test	<0.0001
I	6C	EMG amplitudes comparisons for cold (4°C), neutral (22°C), hot (45°C) when all responses are considered and when only responses >0 are considered	Unpaired, non-parametric	Kruskall-Wallis ANOVA with Dunn's post-test's post tests	<0.0001
		Cold vs. cold		Kolmogorov-Smirnov t-test	0.9961
		Neutral vs. neutral		Kolmogorov-Smirnov t-test	<0.0001
		Hot vs. hot		Kolmogorov-Smirnov t-test	<0.0001.
J	N/A	Comparison of amplitudes after cold (4°C) stimulations for right and left FL	Unpaired, non-parametric	Kolmogorov-Smirnov t-test	0.1019
K	N/A	Comparison of latencies after cold (4°C) stimulations for right and left FL d	Unpaired, non-parametric	Kolmogorov-Smirnov t-test	0.3144

Abbreviations: -5N, trigeminal transection; -obex, transection of the neuraxis, caudally to the obex; -skin, facial skin removal; N/A, non-applicable

Supplementary Table 1. Average FL response in behavioral observation experiments.

	Figure	Experimental condition	n (specimens)	n (stim)	Mean (%)	s.e.m. (%)
A	3A	4°C	5	50	100.0	0.0
		25°C	5	50	6.0	2.5
		35°C	5	50	14.0	7.5
		4°C -5N	5	50	62.0	21.5
		4°C -obex	5	50	34.0	17.2
B	3B	4°C	9	90	100.0	0.0
		25°C	9	90	24.4	5.6
		45°C	9	90	37.8	11.0
		4°C	9	90	100.0	0.0
		4°C -obex	9	90	80.0	8.8
C	3C	4°C	12	120	97.5	1.8
		22°C	12	120	21.7	6.9
		45°C	12	117	24.9	6.8
		4°C -skin	12	120	89.2	6.1
		22°C -skin	12	120	4.2	3.4
		45°C -skin	12	120	10.0	5.2
		4°C -obex	12	120	23.3	10.3
D	3D	21°C	8	80	92.5	4.1
		25°C	8	80	11.3	5.2
		33°C	8	80	5.0	1.9
		4°C	8	80	100.0	0.0
E	N/A	4°C skull	4	40	5.0	3.5
F	N/A	4°C 10 µl	4	40	100.0	0.0

Abbreviations: stim, stimulations; -5N, trigeminal transection; -obex, transection of the neuraxis, caudally to the obex; -skin, facial skin removal; N/A, non-applicable; skull, stimulations directed towards the inside of the skull, to the brainstem and 5G.

Supplementary Table 2. Average amplitude of EMG responses to different temperatures.

	Figure	Experimental condition	N (specimens)	n (stim)	Mean (%)	s.e.m. (%)
A	5A	4°C	8	117	60.1	2.5
		22°C	8	117	10.8	1.6
		4°C -5N	8	100	23.7	3.0
		22°C -5N	7	100	0.3	0.2
		4°C obex	7	88	6.1	1.5
B	5B	4°C	13	84	49.5	3.2
		22°C	13	84	4.4	1.3
		45°C	5	89	13.4	4.2
		45°C -5N	5	70	1.8	0.8
		22°C -5N	13	70	0.4	0.3
C	6C	4°C	13	84	49.5	3.2
		4°C >0	13	69	54.0	3.4
		22°C	13	84	4.4	1.3
		22°C >0	13	15	25.0	4.2
		45°C	5	89	13.4	4.2
		45°C >0	5	29	41.4	11.2
D	N/A	4°C right FL	9	86	49.0	3.4
		4°C left FL	9	86	58.1	3.0

Abbreviations: stim, stimulations; -5N, trigeminal transection; -obex, transection of the neuraxis, caudally to the obex; FL, forelimb; N/A, non-applicable.

Supplementary Table 3. Latency before the onset of response after temperature stimulation in EMG recordings.

	Figure	Experimental condition	n (specimens)	n (stim)	Mean (ms)	s.e.m. (ms)
A	6B	4°C	14	213	768.4	26.5
		22°C	14	68	107.3	68.1
		45°C	5	29	2303.0	184.8
B	N/A	4°C right FL	9	78	879.1	54.0
		4°C left FL	9	78	749.5	37.3

Abbreviations: stim, stimulations; FL, forelimb; N/A, non-applicable.

Supplementary Table 4. Ratio of triceps responses / stimulation attempts in EMG experiments.

Figure	Experimental condition	n (forelimbs)	n (stim)	Responses	Mean % response	s.e.m. (%)
6A	4°C	21	201	194	96.7	1.9
	22°C	30	290	67	23.4	5.3
	45°C	9	89	29	33.0	9.5
	4°C -5N	10	100	62	62.0	13.1
	22°C -5N	17	170	7	4.1	1.7
	45°C -5N	7	70	8	11.4	3.4
	4°C obex	10	88	28	31.8	9.1

Abbreviations: stim, stimulations; -5N, trigeminal transection; -obex, transection of the neuraxis, caudally to the obex.

3. Discussion générale

Les expériences effectuées dans le cadre du présent mémoire avaient pour but de vérifier si la thermosensation pouvait influencer les mouvements des MA de l'opossum nouveau-né. Nous avons posé comme hypothèse de départ que la chaleur du ventre pourrait guider le petit vers les mamelles. Nous nous attendions à ce que les températures chaudes augmentent l'activité des MA lors des expériences. Or, nous avons constaté que ce sont les températures froides qui induisent systématiquement des réponses fortes, bilatérales et parfois même rythmiques. De plus, nos résultats suggèrent que les mécanismes physiologiques de sensation du froid sont indépendants de TRPM8 à cet âge chez l'opossum et il serait intéressant de savoir si ce récepteur prend un rôle plus prépondérant au cours de la maturation.

En effet, TRPM8 est le principal récepteur associé au froid chez les mammifères adultes (Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007; Dhaka et al., 2007; Knowlton et al., 2013; Pogorzala et al., 2013; Yarmolinsky et al., 2016). Chez la souris, l'expression de TRPM8 débute vers E16.5 dans les DRG (Hjerling-Leffler et al., 2007; Tamura et al., 2007), ce qui serait équivalent à environ P3-5 chez l'opossum. Or nos résultats en immunohistochimie et en RT-PCR suggèrent que l'expression de TRPM8 au niveau de la tête de l'opossum ne débiterait pas avant le début de la deuxième semaine post-natale. Même si la comparaison entre régions différentes et espèces différentes est imparfaite, cela suggère que les réseaux sensoriels dépendants de TRPM8 seraient mis en place tardivement chez l'opossum par rapport à la souris. Néanmoins, cette maturation plus tardive ne serait pas sans précédent. En effet, le développement du neuraxe se fait globalement plus lentement chez les marsupiaux que chez les placentaires (Smith, 2001). Des études plus approfondies sur la chronologie de l'expression de TRPM8 sont nécessaires afin de mieux

comparer le développement de la thermosensation entre ces animaux. Il serait tout aussi intéressant de réaliser ces expériences pour TRPV1, le principal récepteur du chaud chez les euthériens adultes (Pogorzala et al., 2013; Yarmolinsky et al., 2016), par contre ce gène n'a pas été identifié à ce jour chez les marsupiaux.

Un autre problème est que les études sur la thermosensation se font généralement en utilisant des variantes de TRP humains ou murins, pourtant il existe des différences évolutives importantes entre les espèces (Figure 7). Par exemple, chez le poulet et la grenouille, TRPM8 est sensible au froid et au menthol comme chez l'humain et les rongeurs, mais pas à l'icilin qui est un agoniste très puissant de ce récepteur chez les mammifères (Behrendt et al., 2004; Myers et al., 2009; Yamamoto et al., 2016). Un autre exemple est celui de TRPV1, qui se montre sensible à la chaleur chez l'ensemble des vertébrés (Saito et Tominaga, 2015). Pourtant, bien qu'il soit souvent simplement appelé le « *capsaicine receptor* » (récepteur sensible à la capsaïcine) par la communauté scientifique, la variante TRPV1 de poulet est insensible à la capsaïcine (Jordt et Julius, 2002). De plus, d'autres mécanismes de détection du chaud que ceux médiés par TRPV1 doivent exister, car chez des souris KO pour TREK, TRAAK, et TREK-TRAAK, plus de neurones répondent au chaud, mais pas à la capsaïcine (Noel et al., 2009). C'est tout de même TRPA1 qui présente les plus grandes différences évolutives. Chez la drosophile, la grenouille, le lézard, le serpent et le poulet, TRPA1 est sensible au chaud plutôt qu'au froid et chez le poisson zèbre, il ne serait pas thermosensible du tout (Saito et Tominaga, 2015). On rencontre également des différences importantes entre les mammifères pour TRPA1, où celui-ci est sensible au froid chez les rongeurs, mais pas chez les primates, dont l'humain (Chen et al., 2013). Par contre, la sensibilité de TRPA1 face aux substances irritantes est conservée à travers le règne animal (Saito et Tominaga, 2015).

Si TRPM8 n'est pas le récepteur responsable de la perception du froid chez l'opossum nouveau-né, quel ou quels récepteurs sont responsables de la détection de ces températures? Bien que TRPM8 explique en

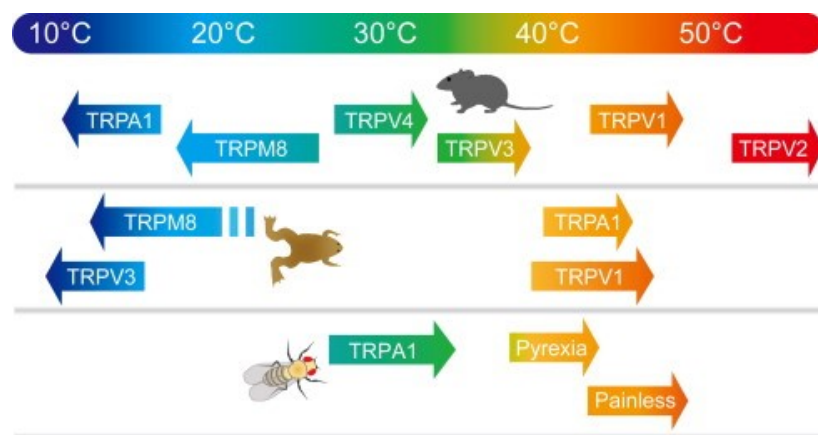


Figure 7. Températures respectivement reconnues par TRPA1, TRPM8 et TRPV1-2-3-4 chez la souris, la grenouille et la drosophile. Tirée de Saito et Tominaga (2015).

grande partie la détection du froid chez les animaux adultes jusqu'ici étudiés, il demeure une population de neurones sensibles au froid et insensibles au menthol qui pourrait expliquer pourquoi les animaux TRPM8^{-/-} ont une sensibilité résiduelle aux températures froides (Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007; Dhaka et al., 2007). Dans le contexte des études sur la thermosensation, la présence d'une réponse cellulaire au menthol signifie qu'elle est médiée par TRPM8. Curieusement dans les neurones sensoriels du poulet, on retrouve une population dominante de neurones qui répondent au froid, mais qui sont insensibles au menthol (Yamamoto et al., 2016). Une proportion assez faible de neurones qui réagissent au froid mais pas au menthol (4.3% dans les DRG) a également été observée chez le rat (Babes et al., 2004; 2006) mais de tels neurones semblent virtuellement absents chez la souris (Yamamoto et al., 2016; Morenilla-Palao et al., 2014). Comme ces mécanismes de détection du froid indépendants de TRPM8 ne sont pas identifiés, il est impossible de savoir s'ils sont similaires chez ces espèces.

Pour expliquer les réponses aux stimulations froides chez l'opossum, d'autres récepteurs moléculaires seraient envisageables. Par exemple, un bon candidat serait TREK-1, car ce dernier est fortement exprimé dans le SNC et l'épithélium olfactif chez la souris à E12 (Aller et Wisden,

2008). Néanmoins, des expériences très préliminaires en immunohistochimie faites dans notre laboratoire ne semblent pas soutenir cette hypothèse. En effet, du marquage pour TREK-1 a été retrouvé dans l'encéphale, mais pas dans les nerfs ni dans la peau. D'autres expériences en immunohistochimie devront être faites pour vérifier la validité de ces résultats préliminaires ainsi que des expériences complémentaires sur préparations *in vitro* utilisant des substances pharmacologiques antagonistes telles que la norfluoxétine pour tester le rôle de TREK-1 (Kennard et al., 2005). De telles expériences pourraient aussi être réalisées pour TREK-2 et TRAAK, qui sont également thermosensibles (Kang et al., 2005) et qui sont exprimés chez la souris à E12 (Aller et Wisden, 2008).

Même si la température n'était pas ressentie par le nouveau-né par un mécanisme similaire à celui des animaux matures, nos résultats montrent que même de faibles baisses de températures provoquent des réponses motrices chez l'opossum nouveau-né. Il est possible que cela lui serve lors de la naissance. En effet, le contraste entre la température de l'utérus de la mère et de la température ambiante pourrait contribuer à déclencher les mouvements qui permettent au petit de se mouvoir jusqu'à une tétine. Comme nos expériences ont montré qu'une baisse de température d'environ 4°C suffit à induire des mouvements des MA chez l'opossum, il est possible que le froid déclenche le mouvement des MA ou y contribue à la naissance. Néanmoins, pour que cette hypothèse tienne la route, la température ambiante doit tout de même être au moins légèrement inférieure à la température corporelle de l'opossum, soit 32,6°C (Dawson & Olson, 1988). Autrement, le contraste pourrait ne pas être suffisant. On retrouve l'opossum gris à queue courte au Brésil, en Bolivie, au Paraguay et à la frontière de l'Argentine (Figure 8A; Macrini, 2004; VandeBerg & Williams-Blangero, 2010). Selon des données récoltées sur une période de 30 ans par l'Organisation météorologique mondiale (OMM), il a été possible de calculer les températures

moyennes maximales et minimales dans 5 villes faisant partie de la zone de distribution géographiques de l’opossum, soit Brasília, Cuiabá et Campo Grande au Brésil, ainsi que Mariscal Jose Felix Estigarribia et Pedro Juan Callabero au Paraguay (Figure 8). Bien que les températures de jour soient généralement près ou au-dessus de 30°C, les températures nocturnes sont toujours sous la barre des 25°C. Il paraît donc possible que le contraste thermique avec la température ambiante influence le petit à la naissance, bien que cela reste à démontrer. En effet, la femelle se fait normalement un nid où elle met bat et il se pourrait qu’à l’intérieur du nid, la température

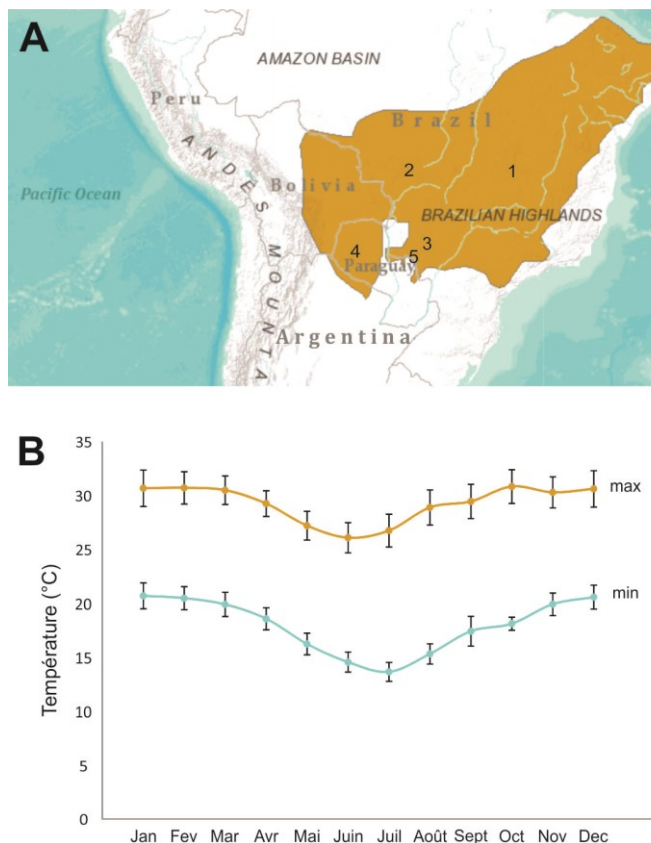


Figure 8. Habitat naturel de *Monodelphis domestica* A) Distribution géographique de l’opossum selon le site de l’International Union for Conservation of Nature. B) Estimation de la température ambiante moyenne dans l’habitat naturel de *M. domestica*, à partir des températures moyennes quotidiennes récoltées sur une période de 30 ans par l’OMM pour les villes de Brasília (1), Cuiabá (2) et Campo Grande (3) au Brésil et de Mariscal Jose Felix Estigarribia (4) et Pedro Juan Callabero (5) au Paraguay.

ambiante et la température de son corps soient très similaires. Néanmoins, chez le chat marsupial (*Dasyurus hallucatus*), le ventre de la femelle gestante présente un gradient de température allant de ~29 à ~31°C entre le sinus urogénital et le marsupium (Nelson et Gemmell, 2005). Si le ventre de la femelle opossum présente un tel gradient au moment de la parturition, la température serait susceptible de jouer un rôle dans les comportements moteurs de l’opossum nouveau-né.

Le froid induit des mouvements des MA très tôt dans le développement de l’opossum, à un stade de développement

équivalent à celui où l'on peut enregistrer des réponses au froid dans les neurones des DRG chez la souris (Hjerling-Leffler et al., 2007). Toutefois, à ma connaissance, personne n'a testé si le froid peut induire une réponse motrice chez l'embryon de souris. Pour déterminer si ce phénomène est unique aux marsupiaux ou s'il a un équivalent dans le développement des placentaires, des études similaires à celles présentées dans ce mémoire pourraient être effectuées chez des embryons de souris, par exemple de E11.5 jusqu'à la naissance, ce qui correspond à la première semaine postnatale de l'opossum.

En conclusion, les expériences effectuées dans le cadre du présent mémoire ont contribué à mieux comprendre quelles modalités sensorielles peuvent influencer les comportements moteurs précoces de l'opossum nouveau-né. Dans le contexte de la naissance chez les marsupiaux, il est possible que le froid stimule un réflexe d'évitement qui conduit le petit à se mouvoir jusqu'aux mamelles. Cette étude suggère également que le décours temporel du développement des réseaux thermosensitifs chez l'opossum suit ce qui a été décrit chez la souris embryonnaire. Chez l'opossum, le développement des réseaux thermosensoriels dépendants de TRPM8, et possiblement de TRPV1, semble se faire presque entièrement postnatalement, ce qui en fait un bon modèle d'étude du développement de la thermosensation. De plus, cette étude supporte l'hypothèse soumise par de nombreux chercheurs voulant que des mécanismes complémentaires de détection du froid indépendants de TRPM8 existent chez les animaux.

Bibliographie

Abe, J., Hosokawa, H., Okazawa, M., Kandachi, M., Sawada, Y., Yamanaka, K., Matsumura, K., & Kobayashi, S. (2005). TRPM8 protein localization in trigeminal ganglion and taste papillae. *Molecular Brain Research*, 136(1–2), 91–98.

Adadja, T., Cabana, T., & Pflieger, J. F. (2013). Cephalic sensory influence on forelimb movement in newborn opossums, *Monodelphis domestica*. *Neuroscience*, 228, 259–270.

Aitkin, L., Cochran, S., Frost, S., Martsi-McClintock, A., & Masterton, B. (1997). Features of the auditory development of the short-tailed Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*: Evoked responses, neonatal vocalizations and synapses in the inferior colliculus. *Hearing Research*, 113(1–2), 69–75.

Aller, M. I., & Wisden, W. (2008). Changes in expression of some two-pore domain potassium channel genes (KCNK) in selected brain regions of developing mice. *Neuroscience*, 151(4), 1154–1172.

Alloui, A., Zimmermann, K., Mamet, J., Duprat, F., Noël, J., Chemin, J., Guy, N., Blondeau, N., Rubat-Coudert, C., Borsotto, M., Romey, G., Heurteaux, C., Reeh, P., Eschalier, A., & Lazdunski, M. (2006). TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *The EMBO Journal*, 25(11), 2368–2376.

Almeida, M. C., Vizin, R. C. L., & Carrettiero, D. C. (2015). Current understanding on the neurophysiology of behavioral thermoregulation. *Temperature*, 2(4), 483–490.

Altman, J., & Bayer, S. A. (1980a). Development of the brain stem in the rat. I. Thymidine-radiographic study of the time of origin of neurons of the lower medulla. *Journal of Comparative Neurology*, 194(1), 1–35.

Altman, J., & Bayer, S. A. (1980b). Development of the brain-stem in the rat .II. Thymidine-radiographic study of the time of origin of neurons of the upper medulla, excluding the vestibular and auditory nuclei. *Journal of Comparative Neurology*, 194(1), 37–56.

Altman, J., & Bayer, S. A. (1980c). Development of the brain stem in the rat. IV. Thymidine-radiographic study of the time of origin of neurons in the pontine region. *The Journal of Comparative Neurology*, 194(4), 905–929.

Arvidsson, J. (1982). Somatotopic organization of vibrissae afferents in the trigeminal sensory nuclei of the rat studied by transganglionic transport of HRP. *Journal of Comparative Neurology*, 21(1), 84–92. <https://doi.org/10.1002/cne.902110108>

Ashwell, K. W. S. (2010a). Development and sexual dimorphism. *The Neurobiology of Australian Marsupials – Brain Evolution in the Other Mammalian Radiation*. Cambridge University Press ; New York. 351p.

Ashwell, K. W. S. (2010b). Ventral hindbrain and midbrain. *The Neurobiology of Australian Marsupials – Brain Evolution in the Other Mammalian Radiation*. Cambridge University Press ; New York. 351p.

Ashwell, K. W. S. (2015). Timing of mammalian peripheral trigeminal system development relative to body size : A comparison of metatherians with rodents and monotremes. *Somatosensory & Motor Research*, 32(3), 187–199.

Ashwell, K. W. S., Hardman, C. D., & Paxinos, G. (2006). Cyto- and chemoarchitecture of the sensory trigeminal nuclei of the echidna, platypus and rat. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 3(2), 81–107.

Ashwell, K. W. S., Marotte, L. R., & Cheng, G. (2008). Development of the olfactory system in a wallaby (*Macropus eugenii*). *Brain, Behavior and Evolution*, 71(3), 216–230.

Askwith, C. C., Benson, C. J., Welsh, M. J., & Snyder, P. M. (2001). DEG/ENaC ion channels involved in sensory transduction are modulated by cold temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(11), 6459–6463.

Azerad, J., Woda, A., & Albe-Fessard, D. (1982). Physiological properties of neurons in different parts of the cat trigeminal sensory complex. *Brain Research*, 246(1), 7–21.

Babes, A., Zorzon, D., & Reid, G. (2004). Two populations of cold-sensitive neurons in rat dorsal root ganglia and their modulation by nerve growth factor. *European Journal of Neuroscience*, 20(9), 2276–2282.

Babes, A., Zorzon, D., & Reid, G. (2006). A novel type of cold-sensitive neuron in rat dorsal root ganglia with rapid adaptation to cooling stimuli. *European Journal of Neuroscience*, 24(3), 691–698.

Baccei, M. L., Bardoni, R., & Fitzgerald, M. (2003). Development of nociceptive synaptic inputs to the neonatal rat dorsal horn: glutamate release by capsaicin and menthol. *The Journal of Physiology*, 549(1), 231–242.

Bandell, M., Macpherson, L. J., & Patapoutian, A. (2007). From chills to chilis: mechanisms for thermosensation and chemesthesis via thermoTRPs. *Current Opinion in Neurobiology*, 17(4), 490–497.

Bandell, M., Story, G. M., Hwang, S. W., Viswanath, V., Eid, S. R., Petrus, M. J., Earley, T. J., & Patapoutian, A. (2004). Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*, 41(6), 849–857.

Barthélemy, D., & Cabana, T. (2005). Postnatal development of limb motor innervation in the opossum *Monodelphis domestica*: Immunohistochemical localization of acetylcholine. *Developmental Brain Research*, 155(2), 87–98.

Bautista, D. M., Jordt, S. E., Nikai, T., Tsuruda, P. R., Read, A. J., Poblete, J., Yamoah, E. N., Basbaum, A. I., & Julius, D. (2006). TRPA1 Mediates the Inflammatory Actions of Environmental Irritants and Proalgesic Agents. *Cell*, 124(6), 1269–1282.

Bautista, D. M., Siemens, J., Glazer, J. M., Tsuruda, P. R., Basbaum, A. I., Stucky, C. L., Jordt, S. E., & Julius, D. (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature*, 448, 204–208.

Behrendt, H., Germann, T., Gillen, C., Hatt, H., & Jostock, R. (2004). Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. *British Journal of Pharmacology*, 141(4), 737–745.

Bidaux, G., Borowiec, A., Gordienko, D., Beck, B., Shapovalov, G. G., Lemonnier, L., Floukaris, M., Vandenberghe, M., Slomianny, C., Dewailly, E., Delcourt, P., Desruelles, E., Ritaine, A., Polakowska, R., Lesage, J., Chami, M., Skryma, R., & Prevarskaya, N. (2015). Epidermal TRPM8 channel isoform controls the balance between keratinocyte proliferation and differentiation in a

cold-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(26), E3345–E3354.

Blivis, D., Mentis, G. Z., O'Donovan, M. J., & Lev-Tov, A. (2007). Differential effects of opioids on sacrocaudal afferent pathways and central pattern generators in the neonatal rat spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, 97(4), 2875–86.

Boothby, K. M., & Roberts, A. (1995). Effects of site of tactile stimulation on the escape swimming responses of hatchling *Xenopus laevis* embryos. *Journal of Zoology*, 235(1), 113–125.

Borsook, D., DaSilva, A. F., Ploghaus, A., & Becerra, L. (2003). Specific and somatotopic functional magnetic resonance imaging activation in the trigeminal ganglion by brush and noxious heat. *The Journal of Neuroscience*, 23(21), 7897–7903.

Boulant, J. A. (2000). Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clinical Infectious Diseases*, 31(Supplement_5), S157-61.

Bouvier, V., Roudaut, Y., Osorio, N., Aimonetti, J.-M., Ribot-Ciscar, E., Penalba, V., Merrot, T., Lebonvallet, N., Le Galle-Ianoto, C., Misery, L., Delmas, P., & Crest, M. (2018). Merkel cells sense cooling with TRPM8 channels. *Journal of Investigative Dermatology*, 138(4), 946–956.

Buhl, E., Roberts, A., & Soffe, S. R. (2012). The role of a trigeminal sensory nucleus in the initiation of locomotion. *Journal of Physiology*, 590(10), 2453–2469.

Cabana, T. (2000). The development of mammalian motor systems: The opossum *Monodelphis domestica* as a model. *Brain Research Bulletin*, 53(5), 615–626.

Cahalan, M. D. (2009). STIMulating store-operated Ca^{2+} entry. *Nature Cell Biology*, 11(6), 669–677.

- Cahusac, P. M. B., & Noyce, R. (2007). A pharmacological study of slowly adapting mechanoreceptors responsive to cold thermal stimulation. *Neuroscience*, 148(2), 489–500.
- Cannon, J. R., Bakker, H. R., Bradshaw, S. D., & McDonald, I. R. (1976). Gravity as the sole navigational aid to the newborn quokka. *Nature*, 259, 42.
- Capra, N. F., & Dessem, D. (1992). Central connections of trigeminal primary afferent neurons: topographical and functional considerations. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 4(1), 1–52.
- Cassidy, G., Boudrias, D., Pflieger, J. F., & Cabana, T. (1994). The development of sensorimotor reflexes in the Brazilian opossum *Monodelphis domestica*. *Brain, Behavior and Evolution*, 43, 244–53.
- Cassidy, G., & Cabana, T. (1993). The development of the long descending propriospinal projections in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Developmental Brain Research*, 72(2), 291–299.
- Caterina, M. J. (2003). Vanilloid receptors take a TRP beyond the sensory afferent. *Pain*, 105(1), 5–9.
- Caterina, M. J., Leffler, A., Malmberg, A. B., Martin, W. J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K. R., Koltzenburg, M., Basbaum, A. I., & Julius, D. (2000). Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor. *Science*, 288, 306–313.
- Caterina, M. J., Rosen, T. A., Tominaga, M., Brake, A. J., & Julius, D. (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*, 398, 436–441.

- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, *389*, 816–824.
- Chen, J., Kang, D., Xu, J., Lake, M., Hogan, J. O., Sun, C., Walter, K., Yao, B., & Kim, D. (2013). Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold sensitivity. *Nature Communications*, *4*, 1–7.
- Cho, H., Yang, Y. D., Lee, J., Lee, B., Kim, T., Jang, Y., Back, S. K., Na, H. S., Harfe, B. D., Wang, F., Raouf, R., Wood, J. N., & Oh, U. (2012). The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons. *Nature Neuroscience*, *15*, 1015–1021.
- Chuah, M. I., Tennent, R., & Teague, R. (1997). Developmental anatomy of the primary olfactory pathway in the opossum *Monodelphis domestica*. *Histology and Histopathology*, *12*(3), 799–806.
- Chung, M.-K., Lee, H., & Caterina, M. J. (2003). Warm temperatures activate TRPV4 in mouse 308 keratinocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, *24*(22), 32037–32046.
- Chung, M.-K., Lee, H., Mizuno, A., Suzuki, M., & Caterina, M. J. (2004). 2-Aminoethoxydiphenyl Borate Activates and Sensitizes the Heat-Gated Ion Channel TRPV3. *The Journal of Neuroscience*, *27*(34), 5177–5182.
- Clapham, D. E., Julius, D., Montell, C., & Schultz, G. (2005). Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacological Reviews*, *57*(4), 427–450.
- Colburn, R. W., Lubin, M. L., Stone, D. J., Wang, Y., Lawrence, D., D’Andrea, M. R., Brandt, M. R., Liu, Y., Flores, C. M., & Qin, N. (2007). Attenuated Cold Sensitivity in TRPM8 Null Mice. *Neuron*, *54*(3), 379–386.

Corriveau-Parenteau, E., Cabana, T., & Pflieger, J.-F. (2016a). *Effects of thermal stimulation of the face on limb movements in In vitro preparations of newborn opossums, Monodelphis domestica*. Affiche présentée au 3^e congrès international de l'Institut de Neurosciences de la Timone, Marseille, France.

Corriveau-Parenteau, E., Cabana, T., & Pflieger, J.-F. (2016b). *Effects of thermal stimulation of the face on limb movements in In vitro preparations of newborn opossums, Monodelphis domestica*. Affiche présentée au congrès annuel de Society for Neuroscience, San Diego, USA.

Cosens, D. J., & Manning, A. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*, 224, 285–287.

Craig, A. (2003). Interoception: The sense of the physiological condition of the body. *Current Opinion in Neurobiology*, 13(4), 500–505.

Damann, N., Voets, T., & Nilius, B. (2008). TRPs in Our Senses. *Current Biology*, 18(18), 880–889.

Davis, J. B., Gray, J., Gunthorpe, M. J., Hatcher, J. P., Davey, P. T., Overend, P., Harries, M. H., Latcham, J., Clapham, C., Atkinson, K., Hughes, S. A., Rance, K., Grau, E., Harper, A. J., Pugh, P. L., Rogers, D. C., Bingham, S., Randall, A., & Sheardown, S. A. (2000). *Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia*. *Nature*, 405, 183–187.

Dawson, T. J., & Olson, J. M. (1988). Thermogenic capabilities of the opossum *Monodelphis domestica* when warm and cold acclimated: Similarities between american and australian marsupials. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 89A(1), 85–91.

- De Blas, G. A., Darszon, A., Ocampo, A. Y., Serrano, C. J., Castellano, L. E., Hernández-González, E. O., Chirinos, M., Larrea, F., Beltrán, C., & Treviño, C. L. (2009). TRPM8, a versatile channel in human sperm. *PLOS ONE*, 4(6). e6095.
- Denda, M., Tsutsumi, M., & Denda, S. (2010). Topical application of TRPM8 agonists accelerates skin permeability barrier recovery and reduces epidermal proliferation induced by barrier insult: role of cold-sensitive TRP receptors in epidermal permeability barrier homeostasis. *Experimental Dermatology*, 19(9), 791–795.
- Desmarais, M.-J., Beauregard, F., Cabana, T., & Pflieger, J.-F. (2016). Facial Mechanosensory Influence on Forelimb Movement in Newborn Opossums, *Monodelphis domestica*. *PLOS ONE*, 11(2), e0148352.
- Deuis, J. R., Zimmermann, K., Romanovsky, A. A., Possani, L. D., Cabot, P. J., Lewis, R. J., & Vetter, I. (2013). An animal model of oxaliplatin-induced cold allodynia reveals a crucial role for Nav1.6 in peripheral pain pathways. *Pain*, 154(9), 1749–1757.
- Dhaka, A., Murray, A. N., Mathur, J., Earley, T. J., Petrus, M. J., & Patapoutian, A. (2007). TRPM8 Is Required for Cold Sensation in Mice. *Neuron*, 54(3), 371–378.
- Dostrovsky, J. O., & Hellon, R. F. (1978). Representation of facial temperature in the caudal trigeminal nucleus of the cat. *Journal of Physiology*, 277, 29–47.
- Drummond, H. A., Abboud, F. M., & Welsh, M. J. (2000). Localization of β and γ subunits of ENaC in sensory nerve endings in the rat foot pad. *Brain Research*, 884(1-2), 1–12.
- Erzurumlu, R. S., & Jhaveri, S. (1992). Trigeminal ganglion cell processes are spatially ordered prior to the differentiation of the vibrissa pad. *The Journal of Neuroscience*, 12(10), 3946–3955.

- Erzurumlu, R. S., & Killackey, H. P. (1983). Development of order in the rat trigeminal system. *Journal of Comparative Neurology*, 213(4), 365–380.
- Fadem, B. H. (1987). Activation of Estrus by Pheromones Control in a Marsupial : Factors ' Stimulus and Endocrine Factors. *Science*, 36, 328–332.
- Fadem, B. H., Trupin, G. L., Maliniak, E., VandeBerg, J. L., & Hayssen, V. (1982) Care and breeding of the gray, short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Laboratory animal sciences*, 32, 405–409.
- Filingeri, D. (2016). Neurophysiology of skin thermal sensations. *Comprehensive Physiology*, 6, 1429–1491.
- Fitzgerald, M., & Gibson, S. (1984). The postnatal physiological and neurochemical development of peripheral sensory C fibres. *Neuroscience*, 13(3), 933-944.
- Forbes, D. J., & Welt, C. (1981). Neurogenesis in the trigeminal ganglion of the albino rat: a quantitative autoradiographic study. *Journal of Comparative Neurology*, 199, 133–147.
- Fricke, B., Von Düring, M., Lints, R., Driscoll, M., Stewart, G., Drummond, H., & Dodt, G. (2000). Epithelial Na⁺ channels and stomatin are expressed in rat trigeminal mechanosensory neurons. *Cell and Tissue Research*, 299(3), 327–334.
- Funakoshi, K., Nakano, M., Atobe, Y., Goris, R. C., Kadota, T., & Yazama, F. (2006). Differential development of TRPV1-expressing sensory nerves in peripheral organs. *Cell and Tissue Research*, 323(1), 27–41.
- Gemmell, R. T., Peters, B., & Nelson, J. (1988). Ultrastructural identification of Merkel cells around the mouth of the newborn marsupial. *Anatomy and Embryology*, 177(5), 403–408.

- Gemmell, R. T., Veitch, C., & Nelson, J. (2002). Birth in marsupials. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 131(4), 621–630.
- Gingras, J., & Cabana, T. (1999). Synaptogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord in the postnatal opossum, *Monodelphis domestica*. *Journal of Comparative Neurology*, 414(4), 551–560.
- Gottlieb, S., Taylor, A., & Bosley, M. A. (1984). The distribution of afferent neurones in the mesencephalic nucleus of the fifth nerve in the cat. *Journal of Comparative Neurology*, 228(2), 273–283.
- Güler, A. D., Lee, H., Iida, T., Shimizu, I., Tominaga, M., & Caterina, M. (2002). Heat-Evoked Activation of the Ion Channel, TRPV4. *Journal of Neuroscience*, 22(15), 6408–6414.
- Guo, A., Simone, D. A., Stone, L. S., Fairbanks, C. A., Wang, J., & Elde, R. (2001). Developmental shift of vanilloid receptor 1 (VR1) terminals into deeper regions of the superficial dorsal horn: Correlation with a shift from TrkA to Ret expression by dorsal root ganglion neurons. *European Journal of Neuroscience*, 14(2), 293–304.
- Hardie, R. C., & Minke, B. (1992). The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron*, 8(4), 643–651.
- Hartman, C. G. (1920). Studies in the development of the opossum *Didelphys virginiana* L. V. The phenomena of parturition. *The Anatomical Record*, 19(5), 251–261.
- Helliwell, R. J. A., McLatchie, L. M., Clarke, M., Winter, J., Bevan, S., & McIntyre, P. (1998). Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia. *Neuroscience Letters*, 250(3), 177–180.

Hensel, H., & Zotterman, Y. (1951). The effect of menthol on the thermoreceptors. *Acta Physiologica Scandinavica*, 24(1), 27–34.

Hjerling-Leffler, J., Alqatari, M., Ernfors, P., & Koltzenburg, M. (2007). Emergence of Functional Sensory Subtypes as Defined by Transient Receptor Potential Channel Expression. *Journal of Neuroscience*, 27(10), 2435–2443.

Ho, S. M. (1997). Rhythmic motor activity and interlimb co-ordination in the developing pouch young of a wallaby (*Macropus eugenii*). *Journal of Physiology*, 501(3), 623–636.

Honoré, E. (2007). The neuronal background K2P channels: focus on TREK1. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(4), 251–261.

Hour, N. L. (2017) *Étude anatomique de la relation entre les neurones exprimant l'hormone de relâche des gonadotrophines et le nerf terminal lors du développement postnatal de l'opossum (Monodelphis domestica)* (Mémoire de maîtrise inédit). Université de Montréal.

Huang, S. M., Li, X., Yu, Y., Wang, J., & Caterina, M. J. (2011). TRPV3 and TRPV4 ion channels are not major contributors to mouse heat sensation. *Molecular Pain*, 7(1), 37.

International Union for Conservation of Nature (2016). The IUCN Red List of Threatened Species: *Monodelphis domestica*. Repéré à <http://maps.iucnredlist.org/>

Ishida, Y., Ugawa, S., Ueda, T., Murakami, S., & Shimada, S. (2002). Vanilloid receptor subtype-1 (VR1) is specifically localized to taste papillae. *Molecular Brain Research*, 107(1), 17–22.

Jones, T. E., & Munger, B. L. (1985). Early differentiation of the afferent nervous system in glabrous snout skin of the opossum (*Monodelphis domestica*). *Somatosensory Research*, 3(2), 169–184.

Jordt, S.-E., Bautista, D. M., Chuang, H., McKemy, D. D., Zygmunt, P. M., Högestätt, E. D., Meng, I. D., & Julius, D. (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*, 427, 260–265.

Jordt, S. E., & Julius, D. (2002). Molecular basis for species-specific sensitivity to “hot” chili peppers. *Cell*, 108(3), 421–430.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, M. T., Siegelbaum, S. A. & Hudspeth, A. J. (2012). *Principles of neural science* (5th ed.). New York: McGraw-Hill, Health Professions Division. 1709p.

Kang, D., Choe, C., & Kim, D. (2005). Thermosensitivity of the two-pore domain K⁺ channels TREK-2 and TRAAK. *Journal of Physiology*, 564(1), 103–116.

Kashio, M., & Tominaga, M. (2017). The TRPM2 channel: a thermo-sensitive metabolic sensor. *Channels*, 11(5), 426-433.

Kemp, T. S. (2005). *The origin and evolution of mammals*. Oxford; New York: Oxford University Press. 331p.

Kennard, L. E., Chumbley, J. R., Ranatunga, K. M., Armstrong, S. J., Veale, E. L., & Mathie, A. (2005). Inhibition of the human two-pore domain potassium channel, TREK-1, by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. *British Journal of Pharmacology*, 144(6), 821–829.

Kido, M. A., Muroya, H., Yamaza, T., Terada, Y., & Tanaka, T. (2003). Vanilloid Receptor Expression in the Rat Tongue and Palate. *Journal of Dental Research*, 92(5), 393–397.

Kiehn, O. (2006). Locomotor Circuits in the Mammalian Spinal Cord. *Annual Review of Neuroscience*, 29(1), 279–306.

- Kitchener, P. D., Hutton, E. J., & Knott, G. W. (2006). Primary sensory afferent innervation of the developing superficial dorsal horn in the South American opossum *Monodelphis domestica*. *Journal of Comparative Neurology*, 495(1), 37–52.
- Knott, G. W., Kitchener, P. D., & Saunders, N. R. (1999). Development of Motoneurons and Primary Sensory Afferents in the Thoracic and Lumbar Spinal Cord of the South American Opossum *Monodelphis domestica*. *Journal of Comparative Neurology*, 414(4), 423–436.
- Knowlton, W. M., Palkar, R., Lippoldt, E. K., McCoy, D. D., Baluch, F., Chen, J., & McKemy, D. D. (2013). A Sensory-Labeled Line for Cold: TRPM8-Expressing Sensory Neurons Define the Cellular Basis for Cold, Cold Pain, and Cooling-Mediated Analgesia. *Journal of Neuroscience*, 33(7), 2837–2848.
- Kraus, D. B., & Fadem, B. H. (1987). Reproduction, development and physiology of the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Laboratory Animal Science*, 37, 478–482.
- Lamoureux, S., Gingras, J., & Cabana, T. (2005). Myelinogenesis in the brachial and lumbosacral enlargements of the spinal cord of the opossum *Monodelphis domestica*. *Brain, Behavior and Evolution*, 65(3), 143–156.
- Langworthy, O. R. (1928). The behavior of pouch-young opossums correlated with the myelination of tracts in the nervous system. *Journal of Comparative Neurology*, 46(1), 201–247.
- Lanthier, F. (2017) *Développement fonctionnel du système vestibulaire chez l’opossum Monodelphis domestica* (Mémoire de maîtrise inédit). Université de Montréal.

- Larsell, O., McCrady, E., & Zimmermann, A. A. (1935). Morphological and functional development of the membranous labyrinth in the opossum. *Journal of Comparative Neurology*, 63(1), 95–118.
- Lavallée, A., & Pflieger, J.-F. (2009). Developmental expression of spontaneous activity in the spinal cord of postnatal opossums, *Monodelphis domestica*: an anatomical study. *Brain Research*, 1282, 1–9.
- Liu, S. C., Lu, H. H., Cheng, L. H., Chu, Y. H., Lee, F. P., Wu, C. C., & Wang, H. W. (2015). Identification of the cold receptor TRPM8 in the nasal mucosa. *American Journal of Rhinology and Allergy*, 29(4), e112–e116.
- Lucarz, A., & Brand, G. (2007) Current considerations about Merkel cells. *European Journal of Cell Biology*, 86, 243–251
- Macrini, T. E. (2004). *Monodelphis domestica*. *Mammalian Species*, 760, 1–8.
- Maingret, F., Lauritzen, I., Patel, A. J., Heurteaux, C., Reyes, R., Lesage, F., Lazdunski, M., & Honoré, E. (2000). TREK-1 is a heat-activated background K⁺ channel. *The EMBO Journal*, 19(11), 2483–2491.
- Majhi, R. K., Saha, S., Kumar, A., Ghosh, A., Swain, N., Goswami, L., Mohapatra, P. P., Maity, A., Sahoo, V. K., Kumar, A., & Goswami, C. (2015). Expression of temperature-sensitive ion channel TRPM8 in sperm cells correlates with vertebrate evolution. *PeerJ*. 3:e1310.
- Mandadi, S., Nakanishi, S. T., Takashima, Y., Dhaka, A., Patapoutian, A., McKemy, D. D., & Whelan, P. J. (2009). Locomotor Networks are Targets of Modulation by Sensory Transient

Receptor Potential Vanilloid 1 and Transient Receptor Potential Melastatin 8 Channels. *Neuroscience*, 162(4), 1377–1397.

Marfurt, C. F. (1981). The central projections of trigeminal primary afferent neurons in the cat as determined by the transganglionic transport of horseradish peroxidase. *Journal of Comparative Neurology*, 203(4), 785–798.

Marics, I., Malapert, P., Reynders, A., Gaillard, S., & Moqrich, A. (2014). Acute heat-evoked temperature sensation is impaired but not abolished in mice lacking TRPV1 and TRPV3 channels. *PLOS ONE*, 9(6), e99828.

Martínez-López, P., Treviño, C. L., De La Vega-Beltrán, J. L., De Blas, G., Monroy, E., Beltrán, C., Orta, G., Gibbs, G. M., O'Bryan, M. K., & Darszon, A. (2011). TRPM8 in mouse sperm detects temperature changes and may influence the acrosome reaction. *Journal of Cellular Physiology*, 226(6), 1620–1631.

Mate, K. E., Robinson, E. S., VandeBerg, J. L., & Pedersen, R. A. (1994). Timetable of in vivo embryonic development in the grey short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Molecular Reproduction and Development*, 39(4), 365–374.

McCluskey, S. U., Marotte, L. R., & Ashwell, K. W. S. (2008). Development of the vestibular apparatus and central vestibular connections in a wallaby (*Macropus eugenii*). *Brain, Behavior and Evolution*, 71(4), 271–286.

McKemy, D. D., Neuhausser, W. M., & Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, 416(6876), 52–58.
<https://doi.org/10.1038/nature719>

- Milenkovic, N., Zhao, W.-J., Walcher, J., Albert, T., Siemens, J., Lewin, G. R., & Poulet, J. F. a. (2014). A somatosensory circuit for cooling perception in mice. *Nature Neuroscience*, 17(11), 1560–6.
- Mishra, S. K., Tisel, S. M., Orestes, P., Bhangoo, S. K., & Hoon, M. A. (2011). TRPV1-lineage neurons are required for thermal sensation. *The EMBO Journal*, 30(3), 582–593.
- Montell, C., & Rubin, G. M. (1989). Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, 2, 1313–1323.
- Moqrich, A., Hwang, S. W., Earley, T. J., Petrus, M. J., Muray, A. N., Spencer, K. S. R., Andahazy, M., Story, G., & Patapoutian, A. (2005). Impaired Thermosensation in Mice Lacking TRPV3, a Heat and Camphor Sensor in the Skin. *Science*, 307, 1468–1472.
- Morenilla-Palao, C., Luis, E., Fernández-Peña, C., Quintero, E., Weaver, J. L., Bayliss, D. A., & Viana, F. (2014). Ion Channel Profile of TRPM8 Cold Receptors Reveals a Role of TASK-3 Potassium Channels in Thermosensation. *Cell Reports*, 8(5), 1571–1582.
- Munns, C., AlQatari, M., & Koltzenburg, M. (2007). Many cold sensitive peripheral neurons of the mouse do not express TRPM8 or TRPA1. *Cell Calcium*, 41(4), 331–342 .
- Myers, B. R., Sigal, Y. M., & Julius, D. (2009). Evolution of thermal response properties in a cold-activated TRP channel. *PLOS ONE*, 4(5), e5741.
- Myers, P., & Wetzel, R. M. (1979). New Records of Mammals from Paraguay. *Journal of Mammalogy*, 60(3), 638–641.

- Nelson, J. E., & Gemmell, R. T. (2005). Temperature gradient from the urogenital sinus to the pouch in the pregnant marsupial quoll, *Dasyurus hallucatus*. *Journal of Thermal Biology*, 30(8), 623–627.
- Nicholls, B. Y. J. G., Stewart, R. R., Erulkar, S. D., & Saunders, N. R. (1990). Reflexes, fictive respiration and cell division in the brain and spinal cord of the newborn opossum, *Monodelphis domestica*, isolated and maintained in vitro. *Journal of Experimental Biology*, 15(1), 1–15.
- Noël, J., Zimmermann, K., Busserolles, J., Deval, E., Alloui, A., Diochot, S., Guy, N., Borsotto, M., Reeh, P., Eschalier, A., & Lazdunski, M. (2009). The mechano-activated K channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *The EMBO Journal*, 28(9), 1308–1318.
- Olszewski, J. (1950). On the anatomical and functional organization of the spinal trigeminal nucleus. *Journal of Comparative Neurology*, 92(3), 401–413.
- Organisation météorologique mondiale (2017). Amérique du Sud. Repéré à <http://worldweather.wmo.int/fr/home.html>
- Pajot, J., Pelissier, T., Sierralta, F., Raboisson, P., & Dallel, R. (2000). Differential effects of trigeminal tractotomy on A δ - and C-fiber-mediated nociceptive responses. *Brain Research*, 863(1-2), 289–292.
- Palkar, R., Lippoldt, E. K., & McKemy, D. D. (2015). The molecular and cellular basis of thermosensation in mammals. *Current Opinion in Neurobiology*, 34, 14–19.
- Park, U., Vastani, N., Guan, Y., Raja, S. N., Koltzenburg, M., & Caterina, M. J. (2011). TRP Vanilloid 2 Knock-Out Mice Are Susceptible to Perinatal Lethality But Display Normal Thermal and Mechanical Nociception. *Journal of Neuroscience*, 31(32), 11425–11436.

Patapoutian, A., Peier, A. M., Story, G. M., & Viswanath, V. (2003). ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Neuroscience*, 4, 529–39.

Peier, A. M., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Moqrich, A., Earley, T. J., Hergarden, A. C., Story, G., Colley, S., Hogenesch, J. B., McIntyre, P., Bevan, S., & Patapoutian, A. (2002a). A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science*, 296, 2046–2049.

Peier, A. M., Moqrich, A., Hergarden, A. C., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Story, G. M., ... Patapoutian, A. (2002b). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, 108(5), 705–715.

Pellis, S. M., Pellis, V. C., & Nelson, J. E. (1992). The development of righting reflexes in the pouch young of the marsupial *Dasyurus hallucatus*. *Developmental Psychobiology*, 25(2), 105–125.

Pereira, V., Busserolles, J., Christin, M., Devilliers, M., Poupon, L., Legha, W., Alloui, A., Aissouni, Y., Bourinet, E., Lesage, F., Eschalier, A., Lazdunski, M., & Noël, J. (2014). Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. *Pain*, 155(12), 2534–2544.

Pflieger, J. F., & Cabana, T. (1996). The vestibular primary afferents and the vestibulospinal projections in the developing and adult opossum, *Monodelphis domestica*. *Anatomy and Embryology*, 194(1), 75–88.

Pflieger, J. F., Cassidy, G., & Cabana, T. (1996). Development of spontaneous locomotor behaviors in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Behavioural Brain Research*, 80(1–2), 137–143.

- Phan, H., & Pflieger, J. (2013). Immunolocalization of cation-chloride cotransporters in the developing and mature spinal cord of opossums , *Monodelphis domestica*. *Frontiers in Neuroanatomy*, 7, 1–10.
- Pogorzala, L. A., Mishra, S. K., & Hoon, M. A. (2013). The Cellular Code for Mammalian Thermosensation. *The Journal of Neuroscience*, 33(13), 5533–5541.
- Puzzolo, E., & Mallamaci, A. (2010). Cortico-cerebral histogenesis in the opossum *Monodelphis domestica*: Generation of a hexalaminar neocortex in the absence of a basal proliferative compartment. *Neural development*, 5(1). 1–18.
- Qin, Y. Q., Wang, X. M., & Martin, G. F. (1993). The early development of major projections from caudal levels of the spinal cord to the brainstem and cerebellum in the gray short-tailed Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*. *Developmental Brain Research*, 75(1), 75–90.
- Ran, C., Hoon, M. A., & Chen, X. (2016). The coding of cutaneous temperature in the spinal cord. *Nature Neuroscience*, 19(9), 1201–9.
- Reimer, K. (1996). Ontogeny of hearing in the marsupial, *Monodelphis domestica*, as revealed by brainstem auditory evoked potentials. *Hearing Research*, 92(1–2), 143–150.
- Rhoades, R. W., Enfiejian, H. L., Chiaia, N. L., Macdonald, G. J., Miller, M. W., McCann, P., & Goddard, C. M. (1991). Birthdates of trigeminal ganglion cells contributing axons to the infraorbital nerve and specific vibrissal follicles in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 307(1), 163–175.
- Rossignol, S., Dubuc, R., & Gossard, J.-P. (2006). Dynamic Sensorimotor Interactions in Locomotion. *Physiological Reviews*, 86(1), 89–154.

- Russell, E. M. (1982). Patterns of parental care and parental investment in marsupials. *Biological Reviews*, 57(3), 423–486.
- Saito, M., Iwawaki, T., Taya, C., Yonekawa, H., Noda, M., Inui, Y., Mekada, E., Kimata, Y., Tsuru, A., Kohno, K. (2001). Diphtheria toxin receptor – mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nature Biotechnology*, 19, 746–750.
- Saito, S., & Tominaga, M. (2015). Functional diversity and evolutionary dynamics of thermoTRP channels. *Cell Calcium*, 57(3), 214–221.
- Sanchez-Villagra, M. R., Gemballa, S., Nummela, S., Smith, K. K., & Maier, W. (2002). Ontogenetic and phylogenetic transformations of the ear ossicles in Marsupial mammals. *Journal of Morphology*, 251(3), 219–238.
- Saunders, N. R., Adam, E., Reader, M., & Møllgård, K. (1989). *Monodelphis domestica* (grey short-tailed opossum): an accessible model for studies of early neocortical development. *Anatomy and Embryology*, 180(3), 227–236.
- Schepers, R. J., & Ringkamp, M. (2008). Thermoreceptors and thermosensitive afferents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 34(2), 177–184.
- Schneider, E. R., Anderson, E. O., Gracheva, E. O., Sviatoslav, N., Haven, N., & Haven, N. (2014). Temperature sensitivity of two-pore (K2P) Potassium channels. *Current Topics in Membranes*, 74, 113–133.
- Schneider, N. Y., Fletcher, T. P., Shaw, G., & Renfree, M. B. (2009). The olfactory system of the tammar wallaby is developed at birth and directs the neonate to its mother's pouch odours. *Reproduction*, 138(5), 849–857.

- Shankland, W. E. (2000). The Trigeminal Nerve. Part I: An Over-View. *Cranio*, 18(4), 238–248.
- Shapiro, L. S., Roland, R. M., & Halpern, M. (1997). *Journal of Morphology*, 234(2), 109–29
- Sherrington, C. S. (1917). Reflexes elicitable in the cat from pinna vibrissae and jaws. *The Journal of Physiology*, 51(6), 404–431.
- Shields, C. J. (2016). *Aristotle: De Anima*. Clarendon Aristotle series. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press. 415p.
- Shigenaga, Y., Okamoto, T., Nishimori, T., Suemune, S., Nasution, I. D., Chen, I. C., Tsuru, K., Yoshida, A., Tabuchi, M., Hosoi, M., & Tsuru, H. (1986). Oral and facial representation in the trigeminal principal and rostral spinal nuclei of the cat. *Journal of Comparative Neurology*, 244(1), 1–18.
- Silver, D.L., Hou, L., Somerville, R., Young, M. E., Apte, S. S., (2008) The Secreted Metalloprotease ADAMTS20 Is Required for Melanoblast Survival. *PLOS Genetics*, 4(2): e1000003.
- Smith, G. D., Gunthorpe, M. J., Kelsell, R. E., Hayes, P. D., Reilly, P., Facer, P., Wright, J. E., Jerman, J. C., Walhin, J.-P., Ooi, L., Egerton, J., Charles, J., K., Smart, D., Randall, A. D., Anand, P., & Davis, J. B. (2002). TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature*, 418, 186–190.
- Smith, K. K. (2001). Early development of the neural plate, neural crest and facial regions of marsupials. *Journal of Anatomy*, 199(1-2), 121–141.

Song, K., Wang, H., Kamm, G. B., Pohle, J., Reis, F. C., Heppenstall, P., Wende, H., & Siemens, J. (2016). The TRPM2 channel is a hypothalamic heat sensor that limits fever and can drive hypothermia. *Science*, 353, 1393–1398.

Soyguder, Z., Schmidt, H. H. H. W., & Morris, R. (1994). Postnatal development of nitric oxide synthase type 1 expression in the lumbar spinal cord of the rat: a comparison with the induction of c-fos in response to peripheral application of mustard oil. *Neuroscience Letters*, 180, 188–192.

Stewart, R. R., Zou, D. J., Treherne, J. M., Møllgård, K., Saunders, N. R., & Nicholls, J. G. (1991). The intact central nervous system of the newborn opossum in long-term culture: fine structure and GABA-mediated inhibition of electrical activity. *The Journal of Experimental Biology*, 161(1), 25–41.

Story, G. M., Peier, A. M., Reeve, A. J., Eid, S. R., Mosbacher, J., Hricik, T. R., Earley, T. J., Hergarden, A. C., Andersson, D. A., Hwang, S. W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S., & Patapoutian, A. (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*, 112(6), 819–829.

Sugimoto, T., Fujiyoshi, Y., He, Y. F., Xiao, C., & Ichikawa, H. (1997). Trigeminal primary projection to the rat brain stem sensory trigeminal nuclear complex and surrounding structures revealed by anterograde transport of cholera toxin B subunit-conjugated and Bandeiraea simplicifolia isolectin B4-conjugated horseradish peroxidase. *Neuroscience Research*, 28(4), 361–371.

Swanson, J. J., Kuehl-Kovarik, M. C., Elmquist, J. K., Sakaguchi, D. S., & Jacobson, C. D. (1999). Development of the facial and hypoglossal motor nuclei in the neonatal Brazilian opossum brain. *Developmental Brain Research*, 112(2), 159–172.

- Takashima, Y., Ma, L., & McKemy, D. D. (2010). The development of peripheral cold neural circuits based on TRPM8 expression. *Neuroscience*, 169(2), 828–842.
- Talavera, K., Yasumatsu, K., Voets, T., Droogmans, G., Shigemura, N., Ninomiya, Y., Margolskee, R. F., & Nilius, B. (2005). Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature*, 438, 1022–5.
- Tamura, S., Morikawa, Y., & Senba, E. (2005). TRPV2, a capsaicin receptor homologue, is expressed predominantly in the neurotrophin-3-dependent subpopulation of primary sensory neurons. *Neuroscience*, 130, 223–228.
- Tan, C.-H., & McNaughton, P. A. (2016). The TRPM2 ion channel is required for sensitivity to warmth. *Nature*, 536, 460–3.
- Tashiro, T., Higo, S., & Matsuyama, T. (1984). Soma size comparison of the trigeminal ganglion cells giving rise to the ascending and descending tracts: A horseradish peroxidase study in the cat. *Experimental Neurology*, 84(1), 37–46.
- Taylor, J. S. H., & Guillery, R. W. (1994). Early development of the optic chiasm in the gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Journal of Comparative Neurology*, 350(1), 109–121.
- Thut, P. D., Wrigley, D., & Gold, M. S. (2003). Cold transduction in rat trigeminal ganglia neurons in vitro. *Neuroscience*, 119(4), 1071–1083.
- Tominaga, M., & Calerina, M. J. (2004). Thermosensation and pain. *Journal of Neurobiology*, 61(1), 3–12.
- VandeBerg, J. L. (1990). The gray short-tailed opossum (*monodelphis-domestica*) as a model didelphid species for genetic research. *Australian Journal of Zoology*, 37(3), 235–247.

- VandeBerg, J. L., & Williams-Blangero, S. (2010). The Laboratory Opossum. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*, 8, 246–261.
- Viana Di Prisco, G., Pearlstein, E., Robitaille, R., & Dubuc, R. (1997). Role of sensory-evoked NMDA plateau potentials in the initiation of locomotion. *Science*, 278, 1122–1125.
- Vinay, L., Cazalets, J. R., & Clarac, F. (1995). Evidence for the existence of a functional polysynaptic pathway from trigeminal afferents to lumbar motoneurons in the neonatal rat. *European Journal of Neuroscience*, 7(1), 143–151.
- Vriens, J., Nilius, B., & Voets, T. (2014). Peripheral thermosensation in mammals. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(9), 573–589
- Vriens, J., Owsianik, G., Hofmann, T., Philipp, S. E., Stab, J., Chen, X., Benoît, M., Xue, F., Janssens, A., Kerselaers, S., Oberwinkler, J., Vennekens, R., Gudermann, T., Nilius, B., & Voets, T. (2011). TRPM3 Is a Nociceptor Channel Involved in the Detection of Noxious Heat. *Neuron*, 70(3), 482–494.
- Waite, P. M. E., Ho, S. M., & Henderson, T. A. (2000). Afferent ingrowth and onset of activity in the rat trigeminal nucleus. *European Journal of Neuroscience*, 12(8), 2781–2792.
- Waite, P. M. E., Marotte, L. R., & Leamey, C. A. (1994). Timecourse of Development of the Wallaby Trigeminal Pathway . I . Periphery to Brainstem. *Journal of Comparative Neurology*, 350, 75–95.
- Wang, X. M., Xu, X. M., Qin, Y. Q., & Martin, G. F. (1992). The origins of supraspinal projections to the cervical and lumbar spinal cord at different stages of development in the gray short-tailed Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*. *Developmental Brain Research*, 68(2), 203–216.

- Watanabe, H., Vriens, J., Suh, S. H., Benham, C. D., Droogmans, G., & Nilius, B. (2002). Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), 47044–47051.
- Williams, S., Evan, G., & Hunt, S. P. (1990). Spinal c-fos induction by sensory stimulation in neonatal rats. *Neuroscience Letters*, 109(3), 309–314.
- Woodbury, C. J., Zwick, M., Wang, S., Lawson, J. J., Caterina, M. J., Koltzenburg, M., Albers, K. M., Koerber, H. R., & Davis, B. M. (2004). Nociceptors Lacking TRPV1 and TRPV2 Have Normal Heat Responses. *The Journal of Neuroscience*, 24(28), 6410–6415.
- Xiao, B., Coste, B., Mathur, J., & Patapoutian, A. (2011). Temperature-dependent STIM1 activation induces Ca²⁺ influx and modulates gene expression. *Nature Chemical Biology*, 7(6), 351–8.
- Xu, H., Ramsey, I. S., Kotecha, S. A., Moran, M. M., Chong, J. A., Lawson, D., Ge, Pe., Lilly, J., Silos-Santiago, I., Xie, Y., DiStefano, P. S., Curtis, R., & Clapham, D. E. (2002). TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature*, 418, 181–186.
- Yadav, R., Jaryal, A. K., & Mallick, H. N. (2017). Participation of preoptic area TRPV4 ion channel in regulation of body temperature. *Journal of Thermal Biology*, 66, 81–86.
- Yamamoto, A., Takahashi, K., Saito, S., Tominaga, M., & Ohta, T. (2016). Two different avian cold-sensitive sensory neurons: Transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8)-dependent and -independent activation mechanisms. *Neuropharmacology*, 111, 130–141.

Yamamoto, Y., Hatakeyama, T., & Taniguchi, K. (2009). Immunohistochemical colocalization of TREK-1, TREK-2 and TRAAK with TRP channels in the trigeminal ganglion cells. *Neuroscience Letters*, 454(2), 129–133.

Yarmolinsky, D. A., Peng, Y., Pogorzala, L. A., Rutlin, M., Hoon, M. A., & Zuker, C. S. (2016). Coding and Plasticity in the Mammalian Thermosensory System. *Neuron*, 92(5), 1079–1092.

Young, R. F. (1982). Effect of trigeminal tractotomy on dental sensation in humans. *Journal of Neurosurgery*, 56(6), 812–818.

Young, R. F., Oleson, T. D., & Perryman, K. M. (1981). Effect of trigeminal tractotomy on behavioral response to dental pulp stimulation in the monkey. *Journal of Neurosurgery*, 55(3), 420–430.

Zimmerman, A., Bai, L., Ginty, D. D. (2014) The gentle touch receptors of mammalian skin. *Science* 346, 950-9544

Zimmermann, K., Leffler, A., Babes, A., Cendan, C. M., Carr, R. W., Kobayashi, J. I., Nau, C., Wood, J. N., & Reeh, P. W. (2007). Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Neuroforum*, 13(3), 100–101.

Zimmermann, K., Leffler, A., Fischer, M. M. J., Messlinger, K., Nau, C., & Reeh, P. W. (2005). The TRPV1/2/3 activator 2-aminoethoxydiphenyl borate sensitizes native nociceptive neurons to heat in wildtype but not TRPV1 deficient mice. *Neuroscience*, 135(4), 1277–1284.

Zimmermann, K., Lennerz, J. K., Hein, A., Link, A. S., Kaczmarek, J. S., Delling, M., Uysal, S., Pfiefer, J. D., Riccio, A., & Clapham, D. E. (2011). Transient receptor potential cation channel,

subfamily C, member 5 (TRPC5) is a cold-transducer in the peripheral nervous system.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(44), 18114 LP-18119.